



**You have downloaded a document from
RE-BUS
repository of the University of Silesia in Katowice**

Title: Projektowanie i synteza nowych inhibitorów kinaz tyrozynowych

Author: Jacek Mularski

Citation style: Mularski Jacek. (2019). Projektowanie i synteza nowych inhibitorów kinaz tyrozynowych. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIwersYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii

Jacek Mularski

Projektowanie i synteza nowych inhibitorów kinaz tyrozynowych

Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Chemii Organicznej Instytutu Chemii pod kierunkiem
dr hab. Roberta Musioła

Spis treści

Cel pracy.....	4
Racjonalne projektowanie leków	8
Projektowanie zorientowane na znane fragmenty molekularne	10
Konformery	12
Bioizosteryzm a projektowanie.....	15
Polifarmakologia	16
Metoda łączenia szkieletów	18
Multi-selektywna strategia farmakoterapii	19
Saracatinib – eksperymentalny inhibitor kinaz tyrozynowych	21
Stosowane w leczeniu inhibitory kinaz tyrozynowych	29
Kinazy jako modulatory szlaków komórkowych	35
Mechanizm działania kinazy tyrozynowej.....	38
Aktywacja kinazy	44
Fragment DFG	44
Fragment zawiasowy oraz <i>gatekeeper</i>	45
Szlaki sygnałowe.....	48
Wielocelowa terapia onkologiczna	52
Badania własne	54
Charakterystyka otrzymanych układów styrylochinazoliny	54
Sprężenie układu styrylochinazoliny	55
Ugrupowanie 1,3-benzodioksolu	57
Synteza	58
Badania biologiczne <i>in vitro</i>	62
Omówienie zależności struktura - aktywność.....	70
Wnioski.....	87
Dalsze plany badawcze	88
Część eksperymentalna.....	89
2-Styrylochinazoliny	89
Estry benzenosulfonowe.....	94
4-Aminochinazoliny.....	96
4-Sulfanylochinazoliny	99
Kwasy sulfonowe.....	102
Chlorki kwasów sulfonowych	102
Arylotiole.....	103
Pozostałe reagenty.....	103
Cytowania	104

Cel pracy

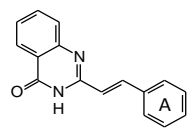
Inhibitory kinaz białkowych są znanymi lekami przeciwnowotworowymi, i od lat prowadzone są w tym zakresie intensywne badania zarówno podstawowe jak i wdrożeniowe. Biorąc pod uwagę ilość klinicznych i przedklinicznych inhibitorów, można przypuszczać jak duży jest rozmiar przestrzeni chemicznej przebadanych kandydatów [1]. Przykładowo, w bazie Reaxys, zapytanie dla frazy *kinaza* zwraca około 850 tys. pozycji w postaci publikacji w czasopiśmie oraz dokumentów patentowych. W pierwszej dziesiątce celów molekularnych wyróżniają się kinazy takie jak receptor nabłonkowego czynnika wzrostu EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), oraz proto-onkogenne niereceptorowe kinazy Src oraz ABL. Taki stan rzeczy może wynikać z globalnych konsekwencji pełnionej przez EGFR roli, która poprzez wychwytywanie czynnika wzrostu EGF z przestrzeni nadbłonowej, inicjuje kaskadę sygnałów do wnętrza komórki. Stanowi więc rodzaj mediatora pomiędzy zewnętrznym otoczeniem a wewnątrzkomórkowymi organellami. Kinaza ABL jest wszechobecną proto-onkogeną niereceptorową kinazą cytoplazmatyczną, pośredniczącą w przekazywaniu sygnału pomiędzy jądrem komórkowym i cytoplazmą, lokującą się w retikulum endoplazmatycznym i mitochondrium. Również proto-onkogenna kinaza Src (skrót od terminu 'sarcoma' - mięsak) bierze udział w regulowaniu wielu aspektów cyklu komórkowego. Proto-onkogeny to geny kodujące białka odpowiedzialne za proliferację. Ich mutacje prowadzić mogą do podwyższonej ekspresji białek, ich wzmożonej aktywności, a także do utraty pierwotnej funkcji bądź pojawienia się nowej.

Efektywna i bezpieczna farmakologiczna terapia przeciwnowotworowa stanowi ogniwo pomiędzy klasyczną chemoterapią, a specyficzną terapią genową. Wszystkie poznane modele nowotworów charakteryzują się obecnością wielu wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych, które funkcjonować mogą niezależnie, równolegle lub być ze sobą sprzężone, promując niekontrolowany wzrost komórek. Wyzwaniem w projektowaniu nowych inhibitorów jest lepsze zrozumienie zależności i funkcji przedmiotowych kinaz w progresji różnych typów nowotworów [2], dostępne poprzez badanie biologicznych właściwości wielocelowych inhibitorów. Dzięki temu można wyciszyć onkogenny sygnał w kilku punktach sieci jednocześnie, a przez to w większym stopniu przeciwdziałać reakcjom obronnym komórki na podawany lek.

Stopień złożoności czynników prowadzących do chorób nowotworowych sprawia, że leki skierowane na jeden cel nie wywierają zamierzonych efektów. Jednocześnie, z uwagi na skomplikowany charakter układów biologicznych, niełatwo kontrolować ich funkcje za pomocą jednej substancji. Z tego względu, ciągle poszukuje się nowych inhibitorów kinaz tyrozynowych, wykazujących zdolność do jednoczesnego hamowania wielu onkogennych kinaz. Również rozwiązanie problemu lekooporności [3] może leżeć u podstaw koncepcji polifarmakologii, opierającej się na oddziaływaniu cząsteczek leków z wieloma różnymi celami molekularnymi. Konieczne staje się więc głębsze zrozumienie efektów mogących odpowiadać za zróżnicowanie oddziaływań pomiędzy białkami i ligandem.

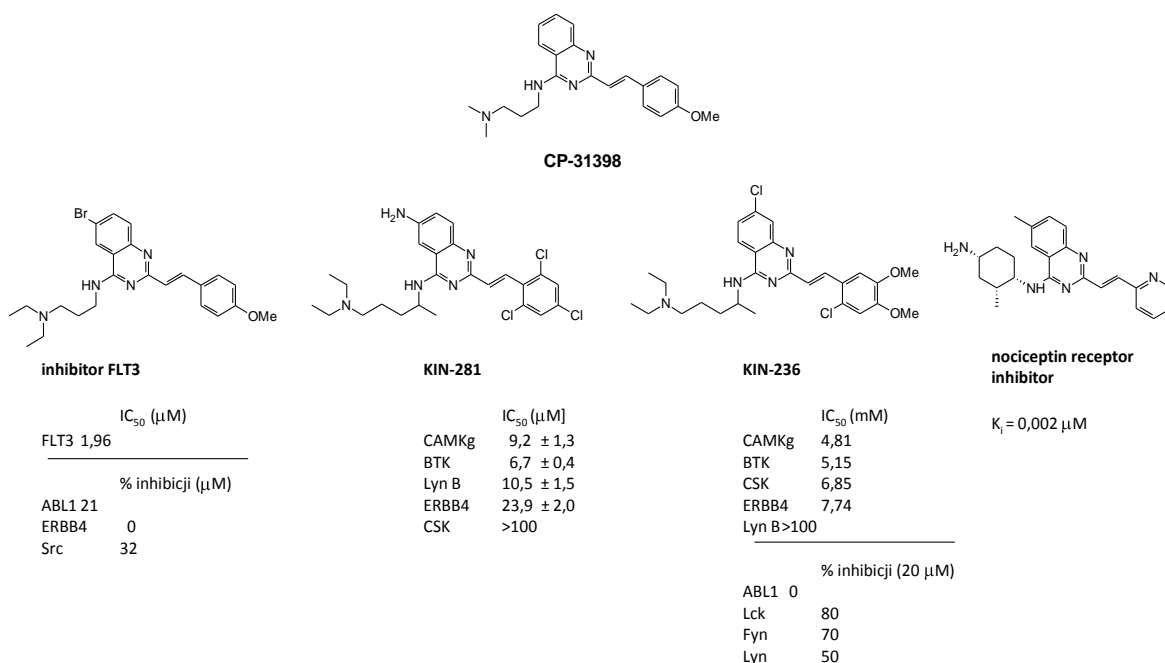
W Zakładzie Chemii Organicznej prowadzone są badania nad spektrum aktywności układów opartych na szkielecie chinazoliny i chinoliny [4]. W **tabeli 1** przedstawiono część wyników z opublikowanej pracy o przeciwnowotworowych właściwościach serii 2-(E)-styrylochinazolinonów.

Tabela 1. Właściwości przeciwnowotworowe serii pochodnych 2-styrylochinazolinonów.

		IC ₅₀ (μM)		
		SK-N-MC	HCT116	NIH3T3
	H	1,39 ± 0,04	2,53 ± 0,31	2,40 ± 0,05
	2-OMe	2,88 ± 0,21	1,58 ± 0,23	1,17 ± 0,07
	2-Br	>6,25	>46	-
	3-OMe	5,13 ± 0,08	-	-
	4-Br	2,85 ± 2,33	-	-

W 1999 roku zaprezentowano szereg małowcząsteczkowych związków, reaktywujących natywną konformację u zmutowanych form białek p53 [5], w tym związek **CP-31398**. Na **rysunku 1** porównać można podobieństwo strukturalne tego reaktywatora względem jego kongenerów, które wykazują zróżnicowaną aktywność biologiczną. Między innymi zdolność do inhibicji szeregu kinaz serynowo-treoninowych, tyrozynowych oraz receptorów bólowych – nocyceptorów.

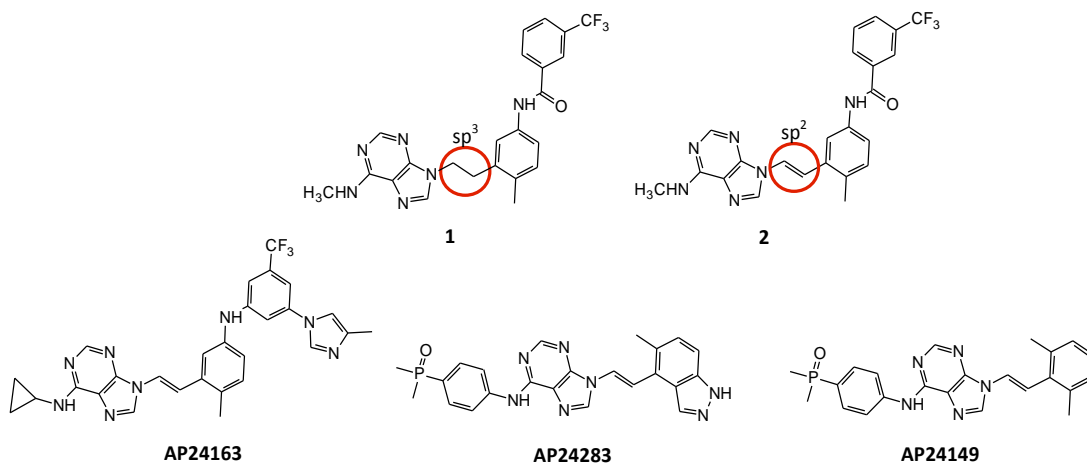
Rysunek 1. Związki oparte na szkielecie 2-styrylochinazoliny: CP-31398 - prototypowy reaktywator białka p53, inhibitor kinazy FLT3 [6], pozostałe: KIN-281 [7], KIN-236 [8], inhibitor receptora nocyceptorowego [9].



Efektywność leku *in vivo* będzie od jego zdolności do hamowania onkogenego sygnału w różnych węzłach układu przekazywania sygnału. Znane są przykłady wielocelowych inhibitorów hamujących aktywność kinazę ABL1 oraz rodzinę kinaz Src, stosowanych w leczeniu (dasatynib, bosutynib, AZD0530/saracatynib). Na **rysunku 2** zaprezentowano eksperymentalne cząsteczki oparte są na szkielecie 9-(arenoetyleno)puryny

[10]. Specyficzne otoczenie rdzenia puryny dyskryminuje to w jaki sposób cząsteczka wiąże się z kinazą, kształtując profil selektywności względem formy dzikiej kinazy ABL1, jej mutantu T315I oraz kinazy Src. Rodzaj podstawników i ich połączeń wpływa więc na zróżnicowane powinowactwo względem specyficznej konformacji w jakiej białko może się znajdować.

Rysunek 2. Wielocelowe inhibitory oparte na szkielecie 9-(arenoetenilo)puryny.



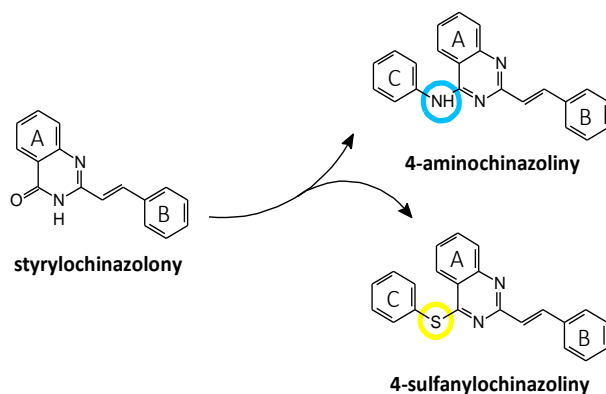
	IC ₅₀ (nM)				
	ABL	ABL ^{T315I}	Src	ABL ^{WT} Ba/F3	Macierzyste Ba/F3
1	96	n.b.	300	>1000	> 9 678
2	25	n.b.	52	47	>10 000
AP24283	<0,5	>10 000	<0,5	11	>10 000
AP24149	3,6	8 900	9,1	190	>10 000
AP24163	25,0	478	7,6	7	6 455

Dokowanie *in silico* oraz badania rentgenostrukturalne pokazują, że obecność podwójnego wiązania o konfiguracji *E* w wypadku zaprezentowanych powyżej struktur 2,6-dwupodstawionych fragmentów adeniny, wpływa korzystnie na odpowiednią akomodację w miejscu aktywnym białka. Fragment winylowy może tworzyć nieklasyczne oddziaływania wodorowe (wiązanie pseudo-wodorowe) z ważnymi obszarami miejsca aktywnego kinazy. Jednym z takich fragmentów jest *gatekeeper* [11]. Sztywniejsza struktura związku **2** w porównaniu do cząsteczki **1**, przekłada się na większą efektywność wiązania się z analogicznymi celami białkowymi. Płaszczyzny wytyczone przez pierścienie aromatyczne pozycjonowane są w miejscu aktywnym białka w podobny sposób do płaszczyzn fragmentów strukturalnych dasatynibu oraz PD166326 [12]. Analiza krystalograficznej struktury związku **AP24283** w kieszeni białka ABL1 (PDB ID: 3KF4) ujawniła, że wiązanie winylowe inhibitora znajduje się w pobliżu fragmentu *gatekeeper*, aminokwasem odgrywającym szczególną rolę regulującą dostęp do miejsca aktywnego enzymu.

Niniejsza rozprawa powstała w wyniku badań mających na celu weryfikację możliwości wykorzystania układów styrylochinazoliny w projektowaniu inhibitorów kinaz tyrozynowych o poszerzonym profilu selektywności. Analiza budowy struktur o podobnej budowie wskazuje na użyteczność zastosowania połączeń heterocyklicznego rdzenia poprzez linker winylowy z

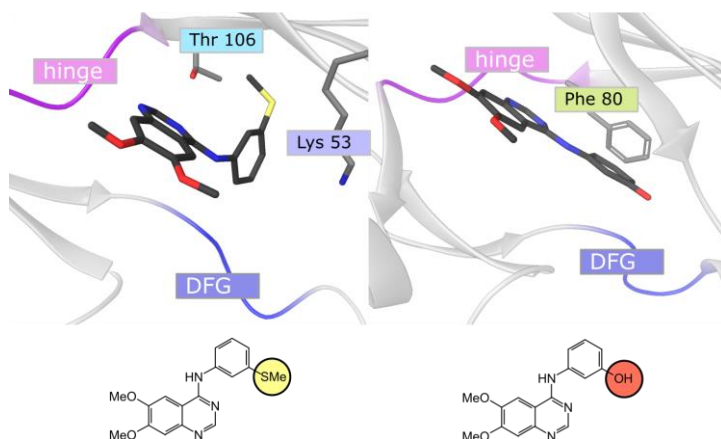
innym aromatycznym fragmentem strukturalnym. Propozycje podzielono na trzy grupy (**rysunek 3**). Pierwszą z nich stanowią układy styrylochinazolonu, będące także prekursorami dwóch kolejnych serii 4-aminochinazolin oraz 4-sulfanylochinazolin. Ligandy będą testowane celem określenia ich biologicznej aktywności względem panelu kinaz z rodziny Src oraz kinazy ABL1.

Rysunek 3. Proponowane serie kongenerycznych pochodnych 4-aminochinazolin oraz 4-sulfanylochinazolin.



Na **rysunku 4** zaprezentowano obraz następstwa związanego, jak to się wydaje, z nieznaczną modyfikacją strukturalną inhibitora opartego na rdzeniu chinazolin [13]. Związek z podstawnikiem $-SCH_3$ to inhibitor kinazy p38, który tworzy w stanie związanym tworzy układ dwupłaszczyznowy. Natomiast ten z podstawnikiem hydroksylowym jest ligandem kinazy CDK2 a jego fragmenty tworzą jedną płaszczyznę. Zmiany strukturalne tego typu wpływać więc mogą na profil aktywności proponowanych kandydatów.

Rysunek 4. Konformacje podobnych strukturalnie motywów inhibitora. DFG – sekwencja Asp-Phe-Gly, hinge – obszar zawiasowy kinazy.



Spekuluje się, że w kinomie kręgowców zakodowanych jest około tysiąc kinaz [14]. Z uwagi na konserwatywność ich architektury a także podobny mechanizm ich funkcjonowania, racjonalne projektowanie wielocelowych, multi-selektywnych cząsteczek nie jest trywialnym zagadnieniem. W niniejszej pracy zadanie projektowania kandydatów skupia się wokół uprzywilejowanego rdzenia 2-styrylochinazolin, który jest dobrym prognostykiem uzyskania wielocelowego działania, pomimo możliwości przybrania przez docelowy ligand

różnorodnych konformacji, podyktowanych specyfiką budowy poszczególnych białek, a homologiczność strukturalna kinaz powinna powodować zwiększenie szansy odkrycia leku wielocelowego, szczególnie mając na uwadze, że kinazy w układzie komórkowym są w stanie dynamicznej równowagi i mogą tworzyć różnorodne jednostki sygnałowe. Chinazolina jest jednym z najczęściej występujących rdzeni w strukturach znanych ligandów [15][16][17], relatywnie łatwo dostępnych na drodze wieloetapowych syntez. Zrozumiałe jest więc, że odnaleźć można obszerny i strukturalnie zróżnicowany zbiór pochodnych zapożyczających szerokie spektrum aktywności biologicznej. W związku z tym omówiono pokrótce także mechanizmy i zależności związane z funkcjonowaniem innych rodzin białek, ponieważ stanowią one integralną część układów sygnałowych komórki. Szczególnie, że przedstawione propozycje mogą wykazywać poszerzony profil aktywności.

Racjonalne projektowanie leków

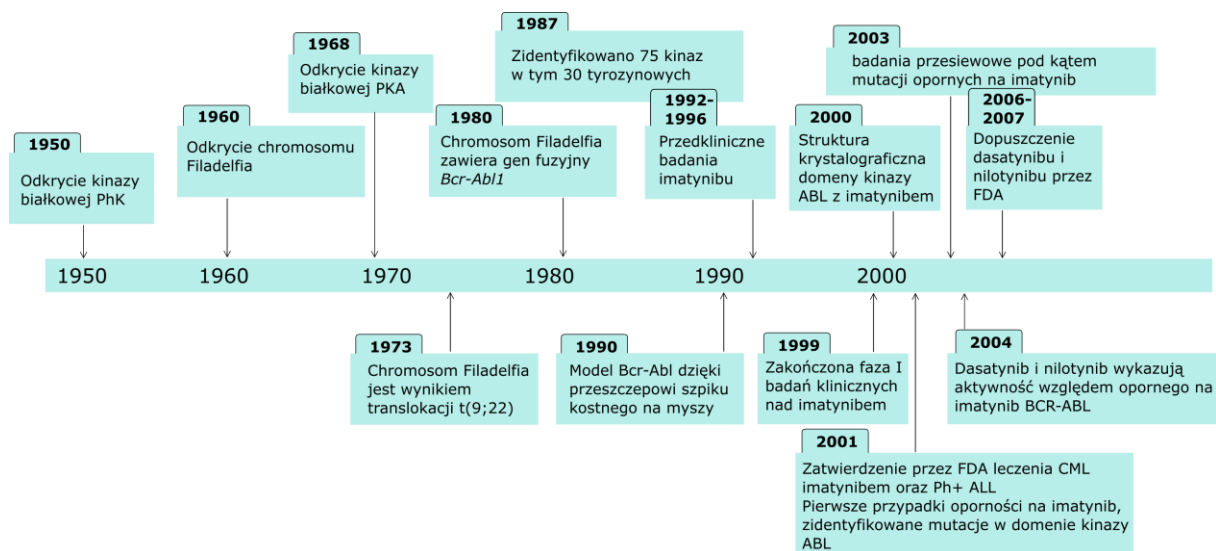
Paul Ehrlich, barwiąc preparaty pigmentami anilinowymi, zauważył ich oddziaływanie na organizmy żywe. W 1891 roku sformułował koncepcję, według której niektóre środki chemiczne mogą zwalczać choroby infekcyjne. Ehrlich, celem swoich badań naukowych uczynił znalezienie „magicznych kul” niszczących patogeny i jednocześnie będących nieszkodliwymi dla organizmu gospodarza. W 1908 roku przyznano mu Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny, za prace nad odpornością organizmów. Współczesna farmakologia wyewoluowała jako dyscyplina łącząca narzędzia warsztatów chemii, biologii, oraz informatyki. Do jej rozwoju przyczyniają się także zdobycze fizyki w postaci instrumentów pozwalających obserwować właściwości materii na różnorodnych poziomach energii, określać strukturę związków chemicznych i ich dynamikę. W dalszym ciągu jednak postulat magicznych kul jest ważny w poszukiwaniu leków.

Mimo że stale rośnie dostępność alternatywnych, innowacyjnych terapii biologicznych, takich jak na przykład terapie genowe, na polu odkryć nowych i udoskonalonych środków farmakologicznych, wciąż dominują związki małowcząsteczkowe. Ich rolą może być naśladowanie endogennych, małowcząsteczkowych substratów, a efektem działanie agonistyczne lub antagonistyczne. Związki małowcząsteczkowe mogą również oddziaływać z białkami poza miejscem aktywnym, czego efektem może być również taka zmiana konformacji białka, która rzutuje na zmianę sposobu interakcji z kolejnymi białkowymi efektorowymi. Za pomocą relatywnie niewielkich chemicznych sond określić można mechanizmy działania biologicznej maszyny schodząc do rozdzielczości rozmiaru atomu. Dzięki dyscyplinie biologii molekularnej, możliwa jest również adekwatna atomizacja badanych zagadnień. Wtedy dostępne staje się określenie efektów wywołanych zmianą pojedynczych atomów w cząsteczce liganda. Co więcej, w wielu przypadkach chemoinformatyczna analiza farmakoforów pokazuje, że pozornie nieomalże identyczne związki chemiczne, wykazują zdumiewającą różnorodność bioaktywności [18].

Proces opracowania nowego leku wiąże się przeciętnie z kilkunastoletnim okresem intensywnych badań, rozciągającym się pomiędzy pracami laboratoryjnymi a lecnictwem.

Schemat 1 ilustruje chronologicznie fazy wdrożenia pierwszego stosowanego w lecznictwie syntetycznego inhibitora kinazy tyrozynowej – imatynibu. W kilka lat później, pojawił się dasatynib i nilotynib, stanowiące leki drugiej linii dla pacjentów opornych na imatynib. Sukces małowczątkowych inhibitorów kinaz tyrozynowych wywołał falę nowych leków.

Schemat 1. Linia czasu reprezentująca okres od odkrycia celu molekularnego do wdrożenia leku oraz towarzyszącymi istotnymi odkryciami - na podstawie [19].



Koszt wdrożenia nowego leku sięga obecnie kwoty rzędu kilku miliardów dolarów. W dużej części związane jest to z nieprzewidywalnymi jak dotąd aspektami przeniesienia badań z fazy *in vitro* do fazy klinicznej. Jednym ze sposobów na ograniczanie tego ryzyka jest klasyfikacja kandydatów na podstawie reguł Lipińskiego lub Verbera [20][21]. Paradoksalnie, bardzo dobre powinowactwo liganda do receptora może być słabym prognostykiem sukcesu na etapie klinicznym, który związany jest z podstawowymi aspektami farmakokinetycznymi, czyli kwestiami związanymi z dystrybucją leku i jego metabolizmem. Możliwe jest jednak zaproponowanie dwóch różniących się strukturą związków chemicznych, będącymi dobrymi ligandami względem tego samego celu molekularnego lecz wykazujących odmienny profil farmakokinetyczny (ADMET). Zagadnienie to związane jest z koncepcją bioizosteryzmu, która zdaniem autora nierozdzielnie związana jest z metodologią racjonalnego projektowania biologicznie aktywnych związków. Szczególnie zauważalne staje się to w obrębie inhibitorów kinaz białkowych, wśród których odnaleźć można prawdopodobnie największy zbiór bioizosterycznych struktur. Sytuacja taka związana jest z dużą konserwatywnością strukturalną miejsca aktywnego kinaz.

Wydaje się, że niemożliwe jest odseparowanie poszczególnych właściwości reprezentowanych przez cząsteczkę związku chemicznego, a więc rozpatrywanie jego struktury elektronowej w oderwaniu od aspektu hydrofobowości. Często obserwuje się problem tego typu przy próbie modyfikacji struktury aktywnej cząsteczki. Poprawienie korzystnej cechy, natury elektronowej, może wiązać się z niekorzystnym efektem hydrofobowym, będącym racjonalizacją tego, że cząsteczki są nierozpuszczalne w wodzie.

Pomimo usilnych dążeń w kierunku wyjaśnienia mechanizmu molekularnego tego zjawiska, obszar ten wzbudza kontrowersje i brak jak dotąd miarodajnego modelu, który byłby użyteczny do przewidywania natury interakcji białko - ligand w tym aspekcie [22]. Natomiast największym ograniczeniem a zarazem najprecyzyjniejszą manipulacją jaką można wykonać poszukując efektywnych i selektywnych leków jest zamiana pojedynczego atomu w cząsteczce.

Siła efektu hydrofobowego co do jej wartości koreluje z geometrią ligandu i najbardziej zaznacza się dla atomów węgla w nierozgałęzionym układzie alifatycznym. Niewielka zmiana struktury cząsteczki przekładać się więc może na relatywnie dużą zmianę siły efektu biologicznego. W równie dużym stopniu jak wpływ polarnych grup, stabilizujących układ ligand-woda-enzym. Ilościową relację zapisać można za pomocą **równania 1**.

Równanie 1. Korelacja pomiędzy energią swobodną Gibbsa a stałą równowagi. Entalpia związana jest z oddziaływaniami jonowymi i wiązaniami wodorowymi. Entropia koreluje ze sztywnością cząsteczki oraz efektem hydrofobowym.

$$K = e^{-\frac{\Delta H - T\Delta S}{RT}}$$

Z termodynamicznego punktu widzenia, rearanżacja cząsteczek wody znajdujących się w miejscu aktywnym enzymu, na skutek wiązania ligandu, związana jest ze zmianą entropii. Wartość jej nie jest łatwa do obliczenia, co pociąga za sobą trudność w wyznaczeniu wartości zmiany energii swobodnej Gibbsa. Reorganizacja wiązań wodorowych, kompensująca energetycznie wywołany efekt hydrofobowy, może wiązać się z zerową, ujemną lub dodatnią zmianą entalpii układu (ΔH).

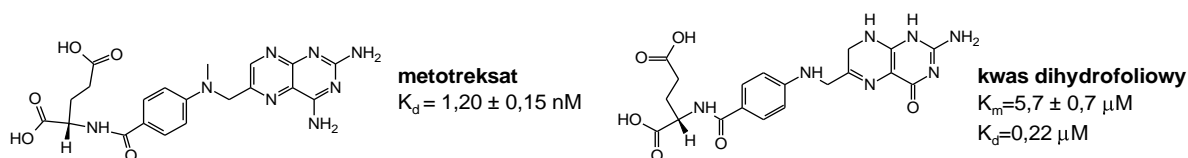
Projektowanie zorientowane na znane fragmenty molekularne

Jedną z metod poszukiwania związków biologicznie aktywnych, odnoszącą się do analogii klucza i zamka, jest projektowanie oparte na znanych ligandach (fragment based drug discovery). Zakłada się, że złożony sposób interakcji cząsteczki leku z białkiem można rozłożyć na czynniki, których suma przekłada się na siłę powinowactwa. W przeciwieństwie do projektowania *de novo*, polegającego na próbie odnalezienia dobrze dopasowanej struktury w środowisku docelowym, tak jakby znajdowała się ona już w miejscu oddziaływania, nie zanedbuje się w tej metodzie aspektów związanych z dynamiką procesu poprzedzającego ustalenie się stanu równowagi. Cząsteczki są iteracyjnie rozbudowywane, poprzez dodawanie kolejnych fragmentów, w oczekiwaniu uzyskania obszerniejszych i efektywniej wiążących się ligandów. Zarówno miejsce aktywne enzymu jak i cząsteczka związku chemicznego, to złożone, wzajemnie oddziałujące na siebie układy. Dodawanie kolejnych fragmentów może spowodować zniwelowanie lub osłabienie interakcji. Ze względu na częste stosowanie uprzywilejowanych motywów strukturalnych w metodzie tego typu, projektowanie oparte na fragmentach wiąże się nierozdzielnie z aspektem polifarmakologii. W konsekwencji, stosunkowo często otrzymuje się związki o poszerzonym profilu aktywności. Do syntezy kandydatów używa się zazwyczaj mniejszych, odpowiednio sfunkcjonalizowanych bloków budulcowych. Dysponując odpowiednio obszerną i zdywersyfikowaną biblioteką

kombinatoryczną, zwiększa się szansę trafienia aktywnego związku. Jednakże projekty badań przesiewowych często są ograniczone wąskim zestawem reakcji, w wyniku których następuje rozbudowa cząsteczki. Często decydującym czynnikiem jest prostota eksperymentu [23]. Chociaż nawet przy wykorzystaniu reaktywnych, polarnych grup funkcyjnych, zdarzają się niekompatybilne substraty [24]. Szczególnie użyteczne są reakcje ortogonalne względem pozostałych potencjalnie reaktywnych miejsc w cząsteczce, takie jak katalizowana miedzią reakcja 1,3-dipolarnej cykloaddycji pomiędzy azydkami oraz alkinami [25]. Fragmenty można także łączyć w sposób, w wyniku czego otrzymuje się pierścień lub układ pierścieni skondensowanych. Zazwyczaj powstają one w wieloetapowych reakcjach, chociaż znane są reakcje wieloskładnikowe, takie jak reakcja Grieco, której jeden z etapów przebiega zgodnie z mechanizmem aza-Dielsa-Aldera. W takim przypadku zazwyczaj powstaje nieekwiwalentna molowo mieszanina dwóch izomerów i bez ich rozdzielenia nie można jednoznacznie rozstrzygnąć który z izomerów odpowiada za większą aktywność. Jeśli na etapie projektowania wiadomo, jakiego typu ugrupowania mogą być przyczyną niestabilności związku lub konfliktu w badaniach biologicznych, można wyeliminować je z biblioteki kombinatorycznej [23].

W budowie związków biologicznie aktywnych często wyodrębnić można charakterystyczne rdzenie heterocykliczne, w sąsiedztwie różnorodnych podstawników. Można przypuszczać, że taki stan rzeczy wynika po części z próby odwzorowania charakteru wiązania się endogennych ligandów, takich jak na przykład ATP, NADPH, lub kwas foliowy. Nie bez znaczenia może być także specyficzna reaktywność heterocyklicznego układu, który łączony jest z kolejnymi fragmentami. Wykorzystanie mimetyków adeniny (np. fragmentu puryny, pterydyny lub chinazoliny), która stanowi fragment strukturalny nukleotydów, wiązać się może z ograniczeniami warsztatu syntezy chemicznej, w szczególności, że dostępność syntetyczna zależy może od kierunku ich rozbudowywania. Jednakże, dokładna próba odwzorowania budowy endogennych ligandów może być nieefektywna i użycie heterocyklicznych rdzeni o zbliżonej budowie może nie przynieść poprawy powinowactwa ligandu do białka. Przykładowo, budowę cząsteczki metotreksatu (**rysunek 5**), można by określić jako zbliżoną do struktury kwasu foliowego, a wykazuje dużo większe powinowactwo do białka [26][27].

Rysunek 5. Porównanie budowy i aktywności leku metotreksat z endogennym ligandem enzymu reduktazy dihydrofolianowej.

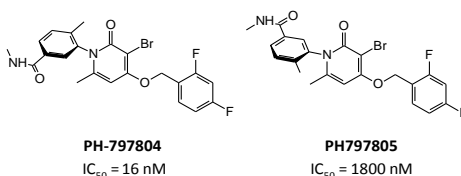


Konformery

Im sztywniejszy jest szkielet cząsteczki tym mniejszy jest zakres jej możliwych do przyjęcia stanów konformacyjnych. To z kolei przekłada się na mniejszą liczbę mikrostanów równowagi pomiędzy cząsteczką a białkiem. Wydaje się także, że modyfikacja płaskich lub odpowiednio sztywnych cząsteczek nie zmieni relatywnej jej orientacji względem miejsca aktywnego enzymu, a raczej uniemożliwi wpasowanie się w specyficzną strukturę kieszeni białka. Usztywnienie cząsteczki jest jedną z klasycznych metod projektowania, pozwalającą kształtować specyficzność leku. Jednakże należy poruszać się w odpowiednio optymalnej pod tym względem przestrzeni chemicznej, ponieważ zbyt rozbudowane płaszczyzny mogą powodować toksyczność poprzez niespecyficzne oddziaływania z białkami i DNA. Z drugiej strony, odpowiedni stopień labilności jest korzystny z uwagi na proces indukowanego dopasowania do białka. Parametr Fsp^3 (fractional sp^3 character/cząstkowy charakter sp^3), przekładający się na liczbę konformerów, został wprowadzony przez Yan i Gasteigera a jego wysoka wartość może być skorelowana z takimi właściwościami związku chemicznego jak niższa temperatura topnienia i większa rozpuszczalność w mediach wodnych [28].

Usztywnienie cząsteczki osiągnąć można nie tylko poprzez tworzenie wiązań kowalencyjnych. Wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania elektronowe lub podstawniki ograniczające lub blokujące swobodną rotację wokół wiązania również wpływać mogą na labilność struktury. Przykładem występowania tego efektu jest struktura prototypowego inhibitora kinazy p38, przedstawiona na **rysunku 6A** [29].

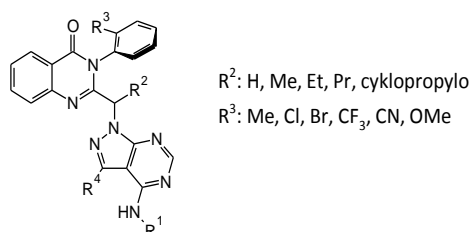
Rysunek 6A. Dwa atropoizomery wykazujące zróżnicowaną aktywność biologiczną względem kinazy p38.



Ponad tysiąckrotna różnica w wartościach IC_{50} obrazuje jak znaczące może być usztywnienie szkieletu cząsteczki z punktu widzenia projektowania leku. Osobną kwestią jest uzyskanie takiego związku w wyniku syntezy chemicznej. Układ reakcyjny może dążyć preferencyjnie do powstawania jednego z izomerów, a rozdzielenie mieszaniny może być kłopotliwe. Szczególnie, jeśli czas półtrwania jednego z układów jest zbyt krótki. Przykład ten pokazuje również, że największym ograniczeniem w projektowaniu leków może być ich otrzymywanie. Nie tylko w ilości pozwalającej określić ich właściwości biologiczne na etapie odkrywania struktury, ale również w skali procesowej, pozwalającej na późniejszą produkcję leku. W dokumencie patentowym WO 2012/040634 A1 [30] zaprezentowano metodę chromatograficzną HPLC służącą wyodrębnieniu atropoizomerów, będących selektywnymi inhibitorami poszczególnych izoform kinaz PI3K (fosfatydylo-3-inozytolowych) [31]. Substancje nie wykazywały więcej niż 5 % interkonwersji w izomer przeciwny, w farmaceutycznej formulacji wodnej w temperaturze 0 °C, w czasie od jednego tygodnia do jednego roku. Jako korzystne cechy wynalazku wymienia się to, aby inhibitor wykazywał

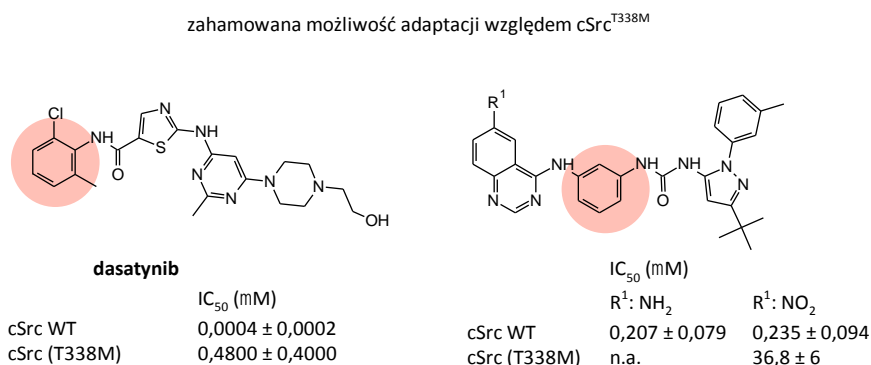
stosunek wartości IC_{50} względem PI3K γ /PI3K δ <10 oraz aby były nieaktywne względem pozostałych izoform. Przykład tych struktur przedstawiono na **rysunku 6B**. Linią falowaną zaznaczono wiązanie względem którego określana jest chiralność. Grupa R^3 reprezentuje podstawniki, które są dostatecznie obszerne aby zaobserwować występowanie atropoizomerów, na skutek zahamowanej rotacji względem wiązania pomiędzy atomami N-C. Grupa R^2 jeśli jest inna niż atom wodoru, znajduje się przy asymetrycznym atomie węgla. Jak podają autorzy, izomery S i R wykazują odmienny profil farmakokinetyczny (okres półtrwania *in vivo*). Podany przykład budzi zainteresowanie z uwagi na zróżnicowanie właściwości biologicznych mających swoją przyczynę w asymetrii strukturalnej o dwojakiej przyczynie. Zauważyć można, że wszystkie poszczególne fragmenty struktury są grupami izosterycznymi, lecz cząsteczki je zawierające z uwagi na odmienny sposób ich przestrzennej aranżacji skutkuje zróżnicowanym powinowactwem względem miejsc aktywnych białek.

Rysunek 6B. Selekttywne inhibitory PI3K. Związki z tej grupy wykazujące chiralność osiową oraz asymetryczny atom węgla, przez co są trudniejsze do wyodrębnienia z mieszaniny izomerów.

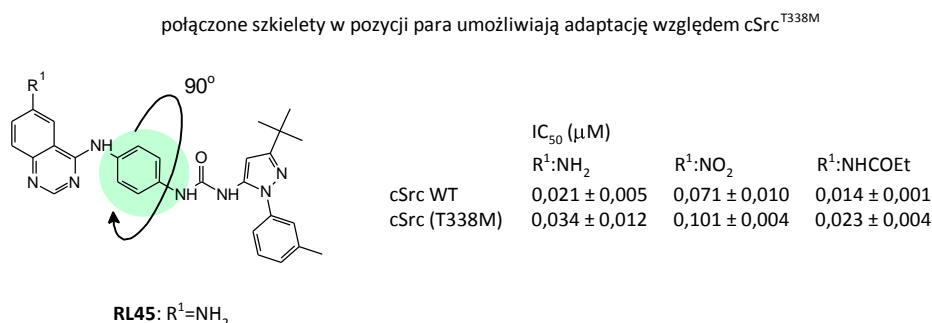


Na **schematach 2A i 2B**, zobrazowano zagadnienie sztywności konformacyjnej na przykładzie prototypowego inhibitora RL45, jego pochodnych oraz dasatynibu. W tym wypadku, to nie sama cząsteczka wykazuje zahamowaną rotację pomiędzy jej fragmentami strukturalnymi, a miejsce aktywne enzymu nie pozwala na swobodne przejście pomiędzy jej stanami konformacyjnymi. Inhibitor RL45 wykazuje wzajemną relację *para* pomiędzy fragmentami (zielone pole). Analog wykazujący podstawienie *meta* podobnie jak dasatynib nie jest w stanie przyjąć korzystnej konformacji. Oczywiście analog *meta* i *para* to dwa różne związki chemiczne, w których odległość pomiędzy poszczególnymi fragmentami strukturalnymi jest inna, jednakże odzwierciedla to typową problematykę projektowania zorientowanego na fragmenty.

Schemat 2A. Wpływ sztywności konformacyjnej na selektywność inhibitora.

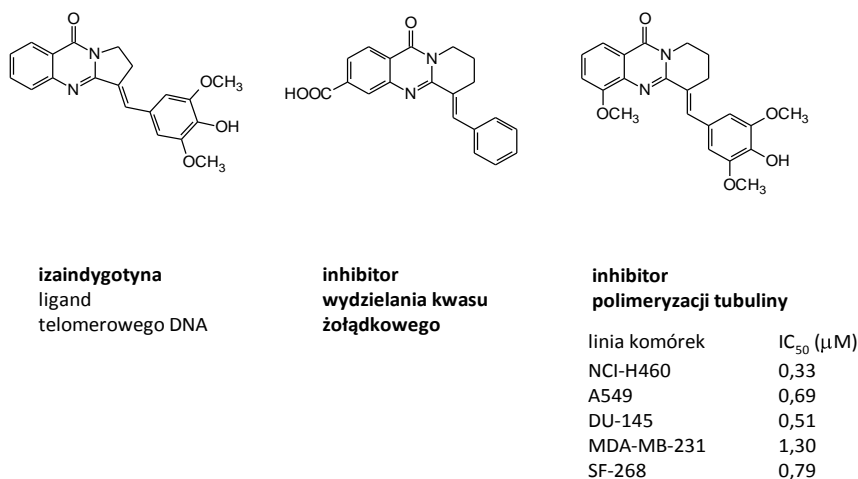


Schemat 2B. Wpływ sztywności konformacyjnej na selektywność inhibitora. Łączenie szkieletów – racjonalne projektowanie inhibitorów Src.



Na **rysunku 7** przedstawione są trzy struktury będące analogami styrylochinazonów z zablokowaną swobodną rotacją fragmentu heterocyklicznego względem wiązania podwójnego.

Rysunek 7. Pochodne chinazonu z zablokowaną rotacją fragmentów przy wiązaniu podwójnym.



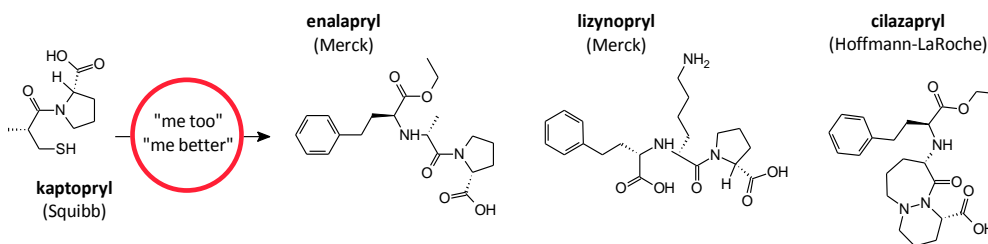
Izaindygotyna (Isaindigotone) jest naturalną substancją wykazującą powinowactwo do telomerowej postaci DNA [32] i nie wykazuje efektu cytotoksycznego dla tych linii komórek, względem których efekt ten jest zauważalny po zastosowaniu inhibitora polimeryzacji tubuliny (**rysunek 7**) [33]. Mimo bardzo zauważalnego podobieństwa strukturalnego tych dwóch ligandów obserwuje się odmienne właściwości biologiczne. Przyczyna takiego stanu rzeczy może leżeć w geometrycznej różnicy pomiędzy pięcioczłonowym pierścieniem izaindygotyny, wykazującym jednocześnie większą sztywność niż pierścień sześcioczłonowy inhibitora tubuliny. Jeszcze inne właściwości, pomimo pewnego podobieństwa, przejawia inhibitor wydzielania kwasu żołądkowego (związane z blokowaniem aktywności ATPazy). Przykład ten obrazuje, że usztywnienie fragmentu cząsteczki może spowodować wzrost selektywności ligandów, a jednocześnie niełatwo jest otrzymać związek działający w sposób efektywny względem zamierzonych celów molekularnych.

Bioizosteryzm a projektowanie

Poszukiwanie biologicznie aktywnych związków można na wstępnym etapie badań określić jako zadanie poszukiwania bioizosterów naturalnych ligandów białkowych. Szczególnie, że znajomość ich budowy często służy jako prototyp podlegający modyfikacjom poprawiającym powinowactwo. Praktyka ta poprzedzała erę biologii molekularnej i zaowocowała odkryciem skutecznych leków. Wykorzystywano w tym celu również obszerny zasób produktów naturalnych, metabolitów wtórnych organizmów roślinnych i morskich, grzybów i bakterii [34][35].

Projektowanie leków w oparciu o bioizostery związane jest z interesującą praktyką wykorzystywaną w przemyśle farmaceutycznym. Mianowicie z lekami „me too” oraz „me better”. Poniższy przykład obrazuje to zagadnienie na polu inhibitorów konwertazy angiotensyny. Protoplasta kaptoprylu opracowany został w koncernie Squibb. Natomiast konkurenci opracowali ulepszone analogi, w oparciu o znajomość budowy miejsca aktywnego enzymu, wykorzystując i rozwijając strukturę kaptoprylu.

Rysunek 8. Struktury kaptoprylu i jego pochodnych.



Jak dotąd nie opublikowano uniwersalnej metody *de novo* poszukiwania bioizosterycznej relacji, mimo że idea ta, [36][37] sięgająca wstecz do prac Langmuira z 1919 roku, wyewoluowała jako zestaw kompleksowych narzędzi bioinformatycznych takich jak wielowymiarowy QSAR. W tamtym czasie terminu izosteryzm używano do opisu podobieństwa cząsteczek lub jonów, wykazujących tę samą ilość atomów oraz elektronów walencyjnych (np. O_2^- , F^- , Ne). W 1925 roku, Grimm zaproponował hipotezę (*Grimm's Hydride Displacement Law*), która opisuje bioizosteryzm jako zdolność pewnych grup chemicznych do naśladowania innych grup chemicznych. Przykładami mogą być grupy SH, NH_2 oraz CH_3 , które są w świetle tej hipotezy bioizosterami atomu tlenu [38][39]. Erlenmeyer rozszerzył klasyfikację Grimma redefiniując izostery jako atomy, jony, i cząsteczki, których peryferyjne powłoki elektronowe mogą być postrzegane jako identyczne [40]. Izostery mogą być wykorzystywane do sprawdzenia w jakim stopniu ważna jest dana grupa wiążąca i czy tworzy ona kluczowe oddziaływania z białkiem. Przykładowo, określić można udział poszczególnych grup w tworzeniu wiązań wodorowych. Zamiana grupy OH na CH_3 spowoduje likwidację oddziaływań wodorowych, natomiast zostaną one zachowane przy wymianie OH na NH_2 . Stosowanie grup bioizosterycznych jest więc także taktyką zaadaptowaną jako narzędzie pozwalające uzyskać podobne właściwości biologiczne używając odmiennych fragmentów strukturalnych, w celu poprawy właściwości fizyko-chemicznych, selektywności,

farmakodynamiki, lub dla pozyskania przestrzeni chemicznej wolnej od restrykcji noszących znamiona własności intelektualnej.

Współczesne odsłony bioizosteryzmu można formułować więc w zależności od kontekstu prowadzonych badań. Przy czym jedna z najpraktyczniejszych, zdaniem autora, określa tym mianem takie związki chemiczne, które zdolne są do rozpoznawania wspólnego farmakofora, rozumianego jako abstrakcyjny opis cech molekularnych, niezbędnych do właściwej interakcji pomiędzy ligandem a biomakromolekułą. Definicja farmakofora według IUPAC opisuje go jako zestaw sterycznych oraz elektronowych cech, jakie są niezbędne do zapewnienia optymalnych interakcji supramolekularnych wobec specyficznego celu molekularnego, oraz do wywołania lub zablokowania jego odpowiedzi biologicznej [41]. Farmakofor stanowi więc rodzaj informacji o topologii i właściwościach elektronowych, które mogą być odzwierciedlane przez różnorodne związki chemiczne.

Stosowanie uprzywilejowanych rdzeni heterocyklicznych do projektowania leków w zharmonizowany sposób wpisuje się w nowy paradygmat w farmakologii, ze względu na relatywnie duży potencjał odkrycia leku wielocelowego. Szczególnie w przypadku chorób metabolicznych odchodzi się od idei, która podkreśla konieczność i korzyść stosowania leków jednocelowych, na rzecz potrzeby projektowania leków wielocelowych. Ów trend stał się istotnie zauważalny na polu inhibitorów kinaz. Nawet sięgając wstecz historii leków, jako przykład korzyści płynących ze stosowania takiej taktyki, może posłużyć aspiryna, wielocelowy niesteroidowy lek przeciwzapalny odkryty w 1899 roku. Wykazuje ona korzystniejszy efekt terapeutyczny pomimo pojawienia się selektywnych inhibitorów COX-2 [42]. Notabene, w ostatnim okresie zauważa się rosnący trend w znaczeniu badań nad korelacją pomiędzy stosowaniem tych inhibitorów a efektem przeciwnowotworowym [43].

Bioizosteryzm dostrzec można również na przykładzie budowy miejsc aktywnych białek. Szczególnie gdy porównuje się ich międzygatunkowe fenotypy. Pomimo różnej sekwencji aminokwasów, białka te zachowują istotne funkcje. W pewnym sensie, bazowanie na podobieństwie molekularnym bio-maszynierii u organizmów mniej złożonych, stanowi pomost pomiędzy badaniami *in vivo* na modelu zwierzęcym a późniejszymi etapami klinicznymi.

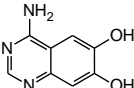
Polifarmakologia

Idea struktur uprzywilejowanych została zaproponowana przez Evansa w 1988 roku [44] i odzwierciedla zdolność wybranych fragmentów strukturalnych do zaadaptowania różnorodnych farmakoforów i przez to odnaleźć można je pośród struktur związków o różnorodnych właściwościach biologicznych [45]. Koncepcja została także ujęta w definicję przez IUPAC po przeanalizowaniu bazy danych MDL Drug Data Report™, jako podstruktura, która często zawiera pół-sztywny szkielet, który połączony z wieloma hydrofobowymi fragmentami, nie ulegnie hydrofobowemu zapadnięciu [46]. Zgodnie z tą definicją, wspólnym mianownikiem definicji struktury uprzywilejowanej, jest obecność pół-sztywnego szkieletu wykazującego właściwości farmakoforowe i hydrofobowe na jej obrzeżach. Co więcej,

badania potwierdzają, że szkielety uprzywilejowane stanowiące rdzeń leko-podobnych ligandów dopasowują się względem konserwatywnych miejsc wiążących pośród różnorodnych białek [47][48]. Można zauważyć, że struktury uprzywilejowane występować powinny szczególnie pośród produktów naturalnych, z uwagi na ewolucyjną optymalizację struktury ligandów białkowych. W ostatnim czasie obserwuje się wzrost liczby zatwierdzanych leków wielocelowych. Porównując dwa okresy, dla nowo zatwierdzonych leków, wzrasta średnia liczba ich celów molekularnych [40]. Z 1,8 sprzed 2006 roku do 2,5 w latach 2006 – 2009. Zdaniem niektórych autorów zyski ze sprzedaży leku mogą również korelować z liczbą celów molekularnych [41].

Ponieważ prawdopodobieństwo odkrycia aktywnej struktury, zwłaszcza względem nieznanego celu molekularnego, jest niewielkie, stosować można podejście wykorzystujące bibliotekę zdywersyfikowanych strukturalnie ligandów (diversity oriented synthesis – DOS [49]). Głównym celem takiego rozwiązania jest synteza leko-podobnych związków chemicznych. Jednakże kluczowe wyzwanie związane jest z pozyskaniem odpowiednio heterogennej biblioteki. Jedną z efektywnych strategii jaką można zaproponować jest synteza zorientowana na zdywersyfikowane fragmenty z wykorzystaniem struktur uprzywilejowanych (privileged substructure-based DOS – pDOS). Stosując strukturę uprzywilejowaną, można wpływać za pomocą podstawników na właściwości biologiczne ligandu. Jednakże lek zbudowany na takim szkielecie, może nie wykazywać dostatecznej selektywności. Chinazolina jest jednym z przykładów struktur uprzywilejowanych, a związki oparte na jej fragmencie wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej [50]. W szczególności odnaleźć ją można pośród szerokiego wachlarza inhibitorów kinaz tyrozynowych [51]. Różnorodne fragmenty uprzywilejowane wyselekcjonować można na podstawie analizy budowy związków naturalnych [52]. W krystalograficznych bazach danych (rok 2014) znajduje się około 4 000 kompleksów kinaza-inhibitor, w tym populacja około 1 600 kompleksów kinaz tyrozynowych. Ekstrakcja tych danych pozwoliła zidentyfikować około 600 unikalnych fragmentów strukturalnych, oddziałujących z donorami i akceptorami w regionie zawiasowym kinazy [51]. Okazuje się, że zdecydowana większość fragmentów ma budowę płaską o znikomym udziale hybrydyzacji sp^3 oraz że wykazują mniejszą lipofilowość niż cząsteczki inhibitora je zawierające. Chociaż większość najczęściej stosowanych rdzeni odnaleźć można pośród kompleksów z wieloma kinazami białkowymi, to spora ich liczba jest unikalna pod względem celu molekularnego. Sugerować to może, że niektóre z nich wykazują mniejszą dyskryminację.

Tabela 2. Zestawienie liczby unikalnych rdzeni oddziałujących w regionie zawiasowym kinazy.

Liczba unikalnych kinaz	Liczba unikalnych rdzeni
1	427
2-5	140
6-10	18
11-20	7
>20	3
42	adenina
4	

W **tabeli 2** zaprezentowano zestawienie obrazujące jaka liczba różnych fragmentów strukturalnych wiąże się z obszarami zawiasowymi u jakiej populacji kinaz. Przykładowo, adenina występuje jako fragment strukturalny dla 42 różnych kompleksów kinaz. Zauważyć można, że wraz ze wzrastającą ilością wspólnych celów molekularnych dla poszczególnego rdzenia, liczba takich wspólnych rdzeni maleje. Wyszczególniono adeninę, stanowiącą rdzeń ATP, oraz rdzeń bazujący na szkielecie chinazoliny. Chinazolinę odnaleziono pośród 13 struktur inhibitorów, celowanych względem kinaz ACK1, ALK5, AURA, CDK2, CHK1, EGFR, EPHB4, IRAK-4, ITK, JNK1, MPS1, P38, SYK. Biorąc pod uwagę częstotliwość występowania, na tle innych fragmentów plasuje się ona pośrodku stawki. Częściej występują fragmenty pirydyny (17 struktur) oraz pirydiminy (19 struktur) i chinoliny (16 struktur). Należy jednak podkreślić, że wynik ten może być konsekwencją większej dostępności syntetycznej ligandów opartych na rdzeniach tego typu a także z innymi aspektami.

Heterocykliczne układy pierścieni skondensowanych stanowią dogodne fragmenty konstrukcyjne do syntezy rozbudowanych szkieletów związków chemicznych. Alokacja atomów azotu w układzie pierścieni skondensowanych, a tym samym także to czy ich wolne pary elektronowe zaangażowane są w zdelokalizowany układ elektronów π , wpływa na reaktywność pierścieni aromatycznych o budowie skondensowanej. W konsekwencji, rdzenie tego typu są nawigatorami syntezy chemicznej o specyficzności podyktowanej przez rodzaj heterocyklicznego układu. Z tego względu, korzystniejsza może być wymiana rdzenia w celu poprawienia dostępności syntetycznej biomimetyki, ponieważ zastąpienie poszczególnego heterocyklu innym, niekoniecznie musi się wiązać z utratą farmakoforowych właściwości.

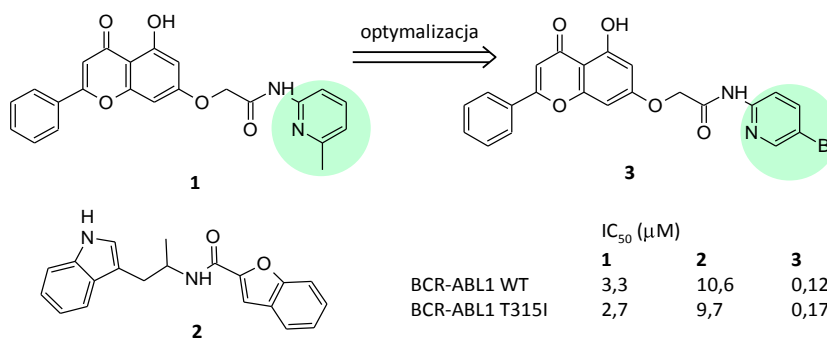
W niniejszej pracy wykorzystano do projektowania inhibitorów niewielkie motywy strukturalne stanowiące fragmenty cząsteczek wykazujących powinowactwo względem różnorodnych celów molekularnych, istotnych z punktu widzenia ich roli w regulowaniu procesów cyklu komórki. Autor pracy zwraca uwagę na białko Hsp90 (białko szoku cieplnego), białko supresorowe p53, rodzinę cytochromów, a także na szereg kinaz serynowo-treoninowych. Zamierzona taktyka tego typu miała na celu zapewnić właściwości antyproliferacyjne związkowi chemicznemu, który w założeniu powinien wykazywać powinowactwo nie tylko do wybranych kinaz tyrozynowych ale i do innych celów molekularnych.

Metoda łączenia szkieletów

W zadaniach związanych z projektowaniem ligandów wielocelowych, wyróżnić można metodę łączenia szkieletów (framework combination). Typowo, wybiera się dwa związki, z których każdy jest dobrym ligandem dla jednego z dwóch różnych celów molekularnych, a następnie próbuje się połączyć cechy strukturalne obu cząsteczek w jedną molekułę w celu otrzymania związku o podwójnej aktywności. Cząsteczki otrzymane w wyniku łączenia szkieletów są więc bioizosterami swoich prekursorów. Zaletą takiego podejścia jest możliwość skorzystania z obfitej wiedzy strukturalnej dostępnej zazwyczaj z poprzednich badań skoncentrowanych na pojedynczych celach terapeutycznych. Połączenie elementów

cząsteczek przeprowadza się na trzy sposoby: przez łączenie (ang. link), stopienie (ang. fuse) lub zlanie (ang. merge) obu cząsteczek ze sobą. W pewnym sensie, opierając projektowanie na znanych strukturach aktywnych ligandów ale z wykorzystaniem uprzywilejowanego motywu strukturalnego, postępuje się analogicznie jak w metodzie łączenia szkieletów. Co więcej, wielocelowe inhibitory można traktować jako zamierzony lub przypadkowy efekt łączenia szkieletów. Wydaje się, że najtrudniejszym zagadnieniem jest osiągnięcie wielocelowości poprzez łączenie szkieletów polegającą na zlewaniu struktur (merge). Na **rysunku 9** przedstawiono przykład takiego eksperymentu bazującego na przesiewowych badaniach *in silico*, z wykorzystaniem znanych celów molekularnych. W rezultacie wyłoniono (**rysunek 9**, struktura **1** i **2**) dwie cząsteczki, o porównywalnej aktywności względem typu dzikiego i zmutowanego białka - BCR-ABL1^{T315I} [53]. Biorąc pod uwagę, że takie dwie izoformy enzymu wykazują odmienną charakterystykę miejsca, które wpływa na zdolność wiązania się z ligandami, to osiągnięcie takiej wielocelowości nie jest łatwe, szczególnie jeżeli poszukuje się dopasowanych ligandów o bardzo dużej aktywności.

Rysunek 9. Przesiewowe badania *in silico* w poszukiwaniu dualnego inhibitora BCR-ABL WT/T315I.



Startowa baza 477 000 związków przesiana została przez filtr reguły Lipińskiego (Lipinski's rule of five). Po wykonaniu operacji klasterowania, otrzymano bazę zawierającą 240 000 struktur. Na podstawie rankingu będącego rezultatem przesiewowych badań *in silico* wybrano po 500 trafień dla ABL typu dzikiego oraz T315I a następnie określono które z nich wykazywać mogą dwukierunkowość inhibicji względem tych celów. Dalsza, racjonalna optymalizacja struktury związku **1** doprowadziła do odkrycia związku **3** o znacznie większej aktywności [54]. Znane są także inne przypadki, gdy dwucelowy inhibitor o efektywności IC₅₀ na poziomie pikomolowych stężeń odkryto *de novo* wykorzystując informację o strukturze celu [55]. W wyniku łączenia szkieletów, podobnie jak w pokrewnej metodzie projektowania zorientowanej na fragmenty, zestaw cech jakie reprezentują poszczególne fragmenty, niekoniecznie jest w prostej linii przekazywany do powstałej hybrydy. Należy mieć na uwadze, że otrzymane w ten sposób cząsteczki mogą być także aktywne względem niezamierzonych celów.

Multi-selektywna strategia farmakoterapii

Poszerzająca się wiedza w zakresie sposobu oddziaływania leku z żywym organizmem, a więc informacja opisująca mechanizm ich działania, rodzaj interakcji lek – cel molekularny,

stanowi inspirację w projektowaniu wysoce specyficznych substancji leczniczych. Jednakże wraz z całym wysiłkiem ukierunkowanym na poznanie molekularnych podstaw działania leku, należy mieć na uwadze to, aby nie wpaść w pułapkę redukcjonizmu. W rzeczy samej hipoteza „one-drug-one-target” może być częściowo odpowiedzialna za relatywny niedostatek nowych substancji leczniczych wobec wciąż rosnących nakładów ponoszonych na badania. W ostatnich latach ograniczenia jakie wynikają z podejścia redukcjonistycznego stały się szczególnie widoczne.

Laureat Nagrody Nobla Roald Hoffmann uchwycił ten problem w następujących słowach: „*Chemistry reduced to its simplest terms, is not physics. Medicine is not chemistry ... knowledge of the specific physiological and eventually molecular sequence of events does not help us understand what a poet has to say to us*” [56].

Medycyna translacyjna oraz inne zintegrowane środowiska badawcze, wskazują na znaczenie funkcjonalnego charakteru układów biologicznych, który w pełni widoczny jest dopiero na poziomie badań *in vivo* [57]. Warto podkreślić tym samym, że osiągnięcie celu jakim jest ligand o powinowactwie nano-molowym i mniejszym, nie odzwierciedla złożoności czynników składających się na leczenie. Przykładowo, pojawiają się dowody sugerujące, że mimo udowodnionego wpływu psychofarmaceutyków na metabolizm neuroprzekazników, mają one niewiele wspólnego z leczeniem schizofrenii [58]. Znane z medycyny ludowej preparaty, pochodzące ze źródeł naturalnych, swój efekt zawdzięczają zazwyczaj obecności więcej niż jednego związku chemicznego. Wyizolowanie jednego ze składników często wiąże się z utratą efektu terapeutycznego.

Komórka funkcjonuje w oparciu o współzależny układ przepływu sygnałów regulujących jej procesy życiowe. Białka bioefektorowe pełnią funkcję wielokierunkowych węzłów przekąźnikowych. Z tego powodu stosowanie wysoko-selektywnych ligandów modulujących aktywność białka prowadzi najczęściej do szybkiego wzrostu tolerancji wobec terapii celowanych. Taki rezultat wytłumaczyć można obecnością białka, zdolnego do przejęcia funkcji onkoproteiny lub zmiany ścieżki sygnałowej/metabolicznej. Alternatywnym, prawdopodobnym scenariuszem, jest zablokowanie innych funkcji na szlaku sygnałowym a nawet blokowanie kinaz występujących we współzależnym sprzężeniu zwrotnym. Przykładowo, inhibitory kinazy serotonino-treoninowej BRAF (Rodzina kinaz Raf, odpowiedzialnych za przekąźnictwo sygnału wzrostu komórkowego), które dezaktywują ścieżkę sygnałową MAPK (aktywowana mitogenem kinaza białkowa; mitogen jest czynnikiem indukującym mitozę komórek), blokują jednocześnie aktywność fosfataz, enzymów negatywnie regulujących EGFR. W konsekwencji, aktywny EGFR podtrzymuje onkogenne przekąźnictwo MAPK. Skuteczna terapia powinna więc obejmować użycie inhibitorów celowanych w oba białka [59]. Zjawisko lekooporności jest złożonym procesem kształtującym się *in vivo*. Ekspresja białek może być regulowana w wyniku podawania leku. Zmienić się może więc również ilość poszczególnych mutantów w układzie. Celując odpowiednio szeroko można próbować przeciwdziałać zjawisku lekooporności. W świetle zmieniającego się paradygmatu farmakologii, nowe wyzwania związane są z projektowaniem leków wielocelowych. Cele te

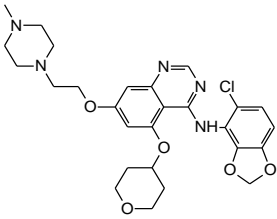
podyktowane są również płynącymi z takiego podejścia oszczędnościami, ponieważ koszt wdrożenia leku specyficznego i wielocelowego może być porównywalny.

Coraz popularniejszą ideą w projektowaniu leków jest „magic shotgun”, będąca kolejną interpretacją polifarmakologii. Opiera się na poszukiwaniu związków wykazujących selektywną-nieselektywność (spektrum aktywności ograniczone do możliwie dużej liczby pożądanych efektów). Konceptyjnie można scharakteryzować inne niekonwencjonalne podejście takie jak HTS – based behavioural screening, które polega na pół-automatycznym badaniu przesiewowym kandydatów wskroś szerokiego spektrum prób behawioralnych (*in vivo*). Metodą tą odkryto przynajmniej dwa innowacyjne antydepresanty (**YKP10A**, **INN 00835**), a żaden z nich nie wykazuje znacznego powinowactwa wobec znanych celów molekularnych w porównaniu do innych znanych antydepresantów [60]. Obydwa związki chemiczne wykazują efektywność we wczesnych fazach badań przedklinicznych. Ważna jest więc kwestia związana z poznaniem odpowiedzi na pytanie jaki efekt wywołuje lek na poziomie całego organizmu, w kontekście jego biologicznej funkcjonalności. W przeciwieństwie do nadmiernie uproszczonych układów eksperymentalnych, takich jak izolowane badania *in vitro*, służące do określenia siły powinowactwa z białkiem [60]. Wszakże przed nadejściem ery biologii molekularnej, dużą rolę odgrywały badania *in vivo* jako pierwszy front poznania właściwości terapeutycznych leku. Można zauważyć, że znaczący spadek liczby wprowadzanych nowych leków przy wzroście ponoszonych kosztów ilustruje ograniczenia związane z paradygmatem redukcjonistycznym w projektowaniu leków.

Saracatinib – eksperymentalny inhibitor kinaz tyrozynowych

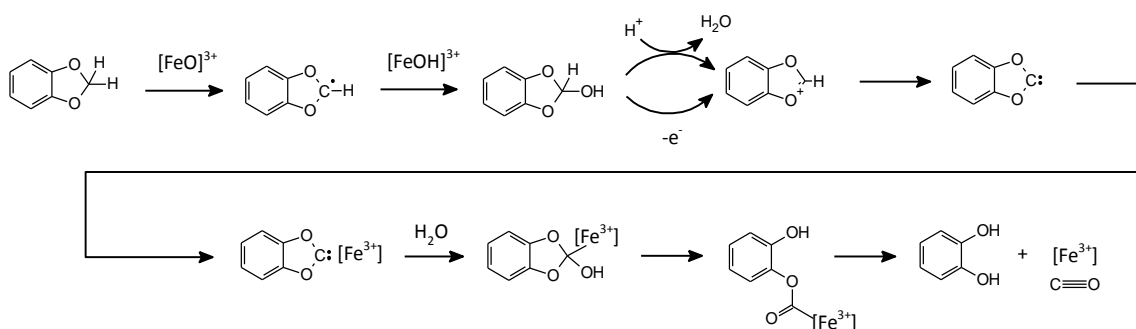
Saracatinib to eksperymentalny (AstraZeneca), wielocelowy inhibitor kinaz tyrozynowych. Wykazuje szczególnie duże powinowactwo względem białek Src, ABL1, Lck oraz Fyn. Są to również między innymi cele molekularne jakie wybrano do przetestowania hipotezy niniejszej rozprawy, szczególnie ze względu na rolę jaką odrywają te białka w regulowaniu cyklu komórkowego. Zaznaczyć można, że jako jeden z nielicznych efektywnie hamuje jednocześnie receptorowe kinazy takie jak EGFR (naskórkowy receptor czynnika wzrostu) i EphB4 (kinaza z rodziny efryn - Eph) związane z produkcją erytropoetyny i stanowią one największą znaną rodzinę receptorowych kinaz tyrozynowych [61]. Nadekspresja receptorów Eph towarzyszy takim nowotworom jak glejak, białaczka, rak piersi, wątroby, płuc oraz jelita. Efryny odgrywają rolę sygnalizacyjną wyłącznie w trakcie bezpośredniego oddziaływania pomiędzy komórkami. Oprócz badań klinicznych prowadzonych w kierunku zastosowania saracatinibu w leczeniu nowotworów, bada się także możliwość zastosowania tego związku w leczeniu choroby Alzheimer'a z uwagi na korelację pomiędzy aktywnością kinazy Fyn w procesie powstawania toksycznego amyloidu w tkankach mózgu [62][197]. Dostępne dane na temat jego szerokiej aktywności zebrano na **rysunku 10**.

Rysunek 10. Właściwości biologiczne saracatynibu. Dane zebrano w oparciu o [63].

	c-Src	IC ₅₀ (μM)
	VEGFR-2	0.0027 ± 0.0005
	Csk	20.9 ± 0.4
	Lck	0.84 ± 0.31
	v-Abl	<0.004
	EGFR	0.03
	CDK-2	2.59
	PI3K	10
	NIH3T3	>10
	A549	0.076 ± 0.01
saracatinib (AZD 0530)		0.14

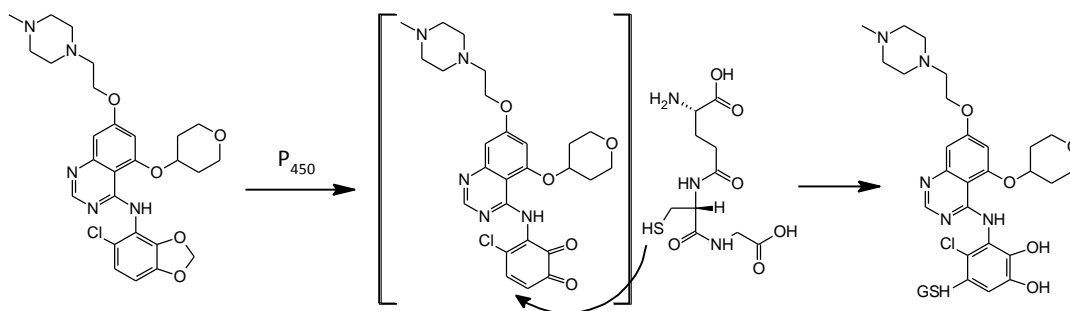
Saracatinib jest także umiarkowanym inhibitorem CYP3A4 (cytochrom z grupy enzymów wykazujących aktywność monooksygenazy), w konsekwencji oddziaływania fragmentu benzodioksolu z atomem żelaza w miejscu aktywnym enzymu [64]. Postuluje się, że reakcja przebiega przez produkt pośredni – karben. Natomiast powstający układ katecholu może być metabolizowany następnie do reaktywnych *orto*-chinonów [65][66].

Schemat 3. Mechanizm metabolizmu 1,3-benzodioksolu poprzez monooksygenazę cytochrom P450 poprzez utworzenie karbenu i jego hydroksylację [67][68].



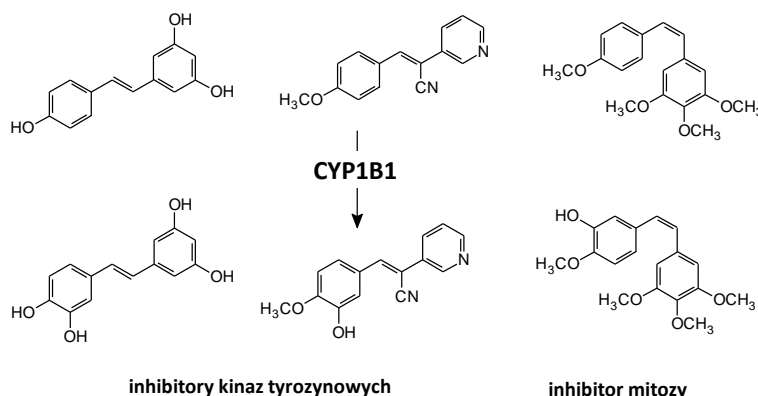
Orto-chinon wykazuje podatność na atak czynników nukleofilowych. **Schemat 4** ilustruje zidentyfikowaną reakcję *in vitro*, zachodzącą pomiędzy cząsteczką będącą metabolitem saracatynibu oraz cząsteczką glutationu [69]. Pokazuje to, że związki z ugrupowaniem 1,3-benzodioksolu mogą zachowywać się jak prekursorzy reaktywnych form leków, aktywowanych w specyficznych organellach komórkowych [70][71].

Schemat 4. Metabolizm saracatynibu. Powstające chinony mogą wykazywać działanie toksyczne.



CYP1B1 należy do rodziny enzymów z grupy cytochromu P450 [72]. Białko to ulega wysokiej ekspresji w komórkach nowotworowych, takich organów jak mózg, piersi, jelito, płuca. Natomiast nie zostało zidentyfikowane w tkankach zdrowych. Chociaż funkcjonalność białka CYP1B1 nie jest dokładnie poznana, to wiadomo że wykazuje aktywność w kierunku hydroksylacji pierścienia aromatycznego i katalizuje przemianę estradiolu do 4-hydroksyestradiolu, który wykazuje działanie kancerogenne i związane może być z rozwojem nowotworu piersi [73]. Z drugiej strony interesujące jest to, że enzym zdolny jest do przemiany resweratrolu do piceatannolu, będącym inhibitorem niektórych kinaz tyrozynowych [74]. W tym aspekcie CYP1B1 można postrzegać jako białko supresorowe. Na **rysunku 11** przedstawiono opatentowane cząsteczki ulegające aktywacji poprzez funkcję CYP1B1, i wykazują one właściwości antyproliferacyjne [75][72].

Rysunek 11. Aktywowane przez CYP1B1 cząsteczki o właściwościach antyproliferacyjnych.

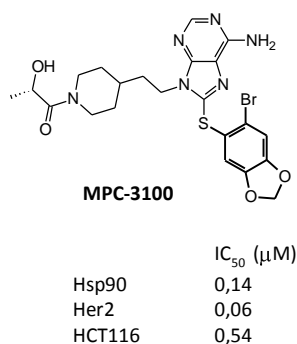


Fragment 1,3-benzodioxolu wyróżnia się na tle innych eterowych pochodnych benzenu pod względem reaktywności chemicznej. Zahamowana rotacja atomów tlenu nie pozwala na sprzężenie ich orbitali *p* z aromatycznym układem elektronów. W przeciwieństwie do układu takiego jak metoksybenzen. Tłumaczy to spadek aktywności względem elektrofilu w reakcji S_{Ar}E w stosunku do metoksybenzen. Z tego samego powodu, a więc specyficznej kierunkowości par elektronowych, obserwuje się odmienny charakter w oddziaływaniach z białkami. Stanowi to sposobność do wprowadzenia atomów tlenu w bliskie sąsiedztwo układu

aromatycznego, lecz z mniejszym efektem elektronodonorowym niż wpływ grupy metoksy. W konsekwencji różnicuje to siłę oddziaływania typu π - π stacking.

Na **rysunku 12** przedstawiono budowę cząsteczki MPC-3100, prototypu inhibitora białka Hsp-90. Rola tego enzymu związana jest z funkcją naprawczą, podtrzymującą prawidłowe funkcjonowanie innych białek. Hsp-90 wykrywa, gdy któreś z rozpoznawalnych przez niego substratów wykazuje konformację odbiegającą od prawidłowej i próbuje usunąć taką usterkę poprzez zmianę tej nieprawidłowej konformacji [76]. Lista substratów białkowych dla Hsp90 zawiera serię znanych onkogenów. Pięć z nich to znane cele onkologiczne: kinazy Her2, (BCR)-ABL1, Src, oraz receptor estrogenowy i androgenowy. Kinazy te wykazują szczególnie wysokie powinowactwo do Hsp90 [77]. Możliwe, że inhibicja białka Hsp90 powoduje zahamowanie aktywności wielu onkogennych celów molekularnych a w konsekwencji spowoduje antyproliferacyjny efekt terapeutyczny. Istotnie, inhibitor ten hamuje wzrost linii komórkowej raka jelita grubego HCT116 na poziomie wartości $IC_{50}=0,54$ μ M. Co ciekawe, MCP-3100 jest także silnym inhibitorem receptorowej kinazy Her2.

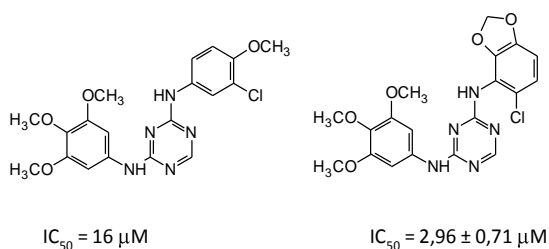
Rysunek 12. Hsp-90 jest ważnym celem molekularnym w terapii onkologicznej [76]. Her2 jest kinazą tyrozynową z rodziny receptorów czynnika wzrostu. HCT116 to linia komórek modelu nowotworu jelita grubego.



Predykcja *in silico* sposobu wiązania się związku MCP-3100 z białkiem Hsp-90 w kieszeni ATP (na podstawie struktury PDB: 1UYI), ujawnia kluczową rolę atomu bromu, dzięki któremu pierścień 1,3-benzodioksolu oddziałuje z pierścieniem fenyloalaniny (π - π) w miejscu aktywnym. Autorzy zaznaczają także rolę tioeterowego połączenia, umożliwiającego przyjęcie przez 1,3-benzodioksol odpowiedniej konformacji względem pierścienia adeniny. Przesłanki te skłoniły autora rozprawy do otrzymania pochodnych 2-styrylochinazoliny z analogicznym fragmentem 5-bromo-6-sulfanylo-2H-1,3-benzodioksolu (związki 6c, 13c, 14c – badania własne).

Analiza budowy ko-kryształów EphB4 ujawnia, że fragment benzodioksolu oddziałuje z fragmentem *gatekeeper* (Thr-693) [78][79]. Brak tego fragmentu skutkował inną konformacją cząsteczki i mniejszym jej powinowactwem do białka.

Rysunek 14. Struktury analogów saracatynibu, inhibitorów białka EphB4.



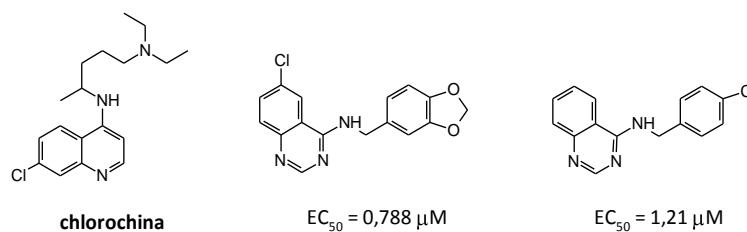
W literaturze odnaleźć można takie struktury inhibitorów kinaz, gdzie fragment 1,3-dioksolanu tworzy heterocykliczny układ o pierścieniach skondensowanych (**rysunek 13**).

Rysunek 13. Porównanie właściwości biologicznych acetalu o różnym rozmiarze pierścienia. Związki te wykazują wielokierunkowe działanie względem kinaz EGFR, FGFR-1, VEGFR-2, PDGFR oraz Src i ABL1 a tym samym efekt antyproliferacyjny względem komórek A431, NH3T3. Wartości IC_{50} (μM) lub % inhibicji przy $C_n=1 \mu M$. Na podstawie [80].

----	linie komórkowe ----		
A431	$0,81 \pm 0,06$	$0,08 \pm 0,01$	$0,66 \pm 0,08$
NH3T3	$0,60 \pm 0,02$	$0,60 \pm 0,02$	$0,92 \pm 0,06$
----	enzymy ----		
EGFR	$0,002 \pm 0,001$	20 %	$0,027 \pm 0,012$
FGFR-1	$0,063 \pm 0,015$	$0,178 \pm 0,030$	$0,063 \pm 0,025$
VEGFR-2	$0,848 \pm 0,110$	50 %	30 %
PDGFRb	$0,243 \pm 0,056$	$0,100 \pm 0,045$	40 %
Src	$0,032 \pm 0,008$	$0,642 \pm 0,105$	$0,645 \pm 0,085$
ABL	$0,051 \pm 0,010$	$0,024 \pm 0,010$	$0,056 \pm 0,016$

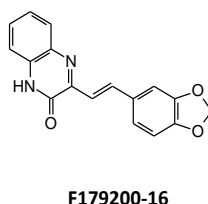
Chlorochina jest jednym z najczęściej stosowanych leków przeciwmalarycznych. Lek ten może aktywować program apoptotyczny (oddziałując z białkiem p53 i kaspazami) lub działać w roli inhibitora procesu autofagii komórki [81][82]. W przypadkach przewlekłej białaczki szpikowej (Chronic myeloid leukemia - CML), inhibicja autofagii na skutek działania chlorochiny znacząco zwiększa toksyczność imatynibu wobec komórek CML linii K562 (model przewlekłej białaczki szpikowej). Komórki BaF3/T315I oraz BaF3/E255K (komórki macierzyste z mutacją ABL), odporne względem imatynibu, można uwrażliwić stosując terapię kombinowaną. Obserwuje się podobny mechanizm, według którego inhibicja autofagii uwrażliwia komórki nowotworowe na apoptozę wywołowaną inhibitorami kinaz [83]. Na **rysunku 16** przedstawiono wzory inhibitorów PI3K (fosfatydylo-3-inozytolowymi), które są mediatorami aktywacji autofagii [84]. Blokowanie tej ścieżki sygnałowej sprzyja inicjowaniu apoptozy. Dodatkowo, warto również zauważyć podobieństwo strukturalne fragmentu chlorochiny do analogicznej podstruktury związku **CP-31398** i jego kongenerycznej serii **KIN**, których aktywność przedstawiono przy okazji celu rozprawy.

Rysunek 16. Chlorochina i inhibitory PI3K z motywem 1,3-benzodioksolu. Wartości EC₅₀ względem linii komórkowej H4-LC3.



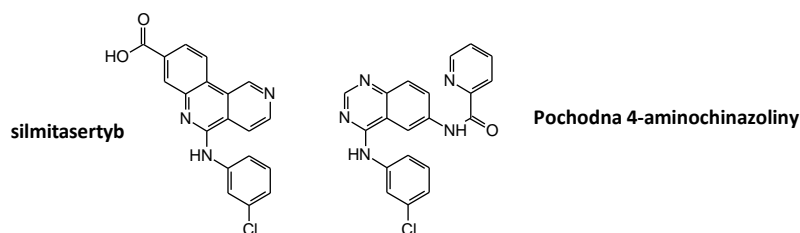
Geny kodujące kinazy białkowe zidentyfikowane u pasożytów, są kluczowe dla poziomu wirulencji na przykład w *Toxoplasma gondii* [85]. Wydzielane są między innymi kinazy takie jak ROP18, wykazujące wysoki stopień polimorfizmu [86]. Postępując się narzędziami chemoinformatycznymi, przeszukano bazy danych pod kątem podobieństwa cząsteczek do struktury ATP. Wyłoniono kandydatów do badań *in vitro*, na podstawie rankingu dokowania cząsteczek do struktury kinazy ROP18, według kryterium podobieństwa do pozycji ATP w tym samym miejscu aktywnym. Najlepiej punktowany kandydatem jest cząsteczka **F1792-0016** (rysunek 18). W testach *in vitro* wykazała aktywność hamowania wzrostu toksoplazmy na poziomie IC₅₀ = 2,1 ± 1,8 nM. Bezpośrednie oddziaływanie z kinazą ROP18 jest jednak, jak postulują autorzy, niekoniecznie pełnym obrazem zachodzących procesów na drodze do śmierci komórek, ponieważ usunięcie genu kodującego ROP18, nie eliminuje całkowicie aktywności przeciwpasożytniczej [86]. Nie jest to odosobniony przypadek, gdzie ligandy projektowane jako inhibitory kinaz, wykazują poszerzony profil aktywności biologicznej, przekładający się na synergistyczny efekt terapeutyczny.

Rysunek 18. Inhibitor kinazy ROP18, toksyczne działanie względem komórek pasożyta *Toxoplasma gondii*.



Silmitasertyb (CX-4945), oraz pochodna 4-aminochinazolin, których struktury przedstawiono na **rysunku 19**, to inhibitory kinazy CK2 (casein kinase II). CK2 zaangażowana jest w różnorodne i kluczowe aspekty homeostazy. Kontroluje wielowątkowo procesy odgrywające ważną rolę w sensytyzacji nowotworu na cząsteczki mogące regulować przekazywanie sygnałów rozchodzących się przy węźle EGFR, takich jak szlak PI3K-Akt-mTOR, Hsp90 oraz inhibicję apoptozy. W 2017 roku FDA dopuściła do stosowania silmitasertybu w rzadkiej postaci nowotworu jakim jest rak przewodów żółciowych. Blokowanie CK2 skutkuje odcięciem przewodnictwa sygnału na drodze PI3K-Akt-mTOR, a w połączeniu z inhibitorami EGFR przynosi większą efektywność [87].

Rysunek 19. Struktura silmitasertybu i jego analog. Inhibitory kinazy CK2.



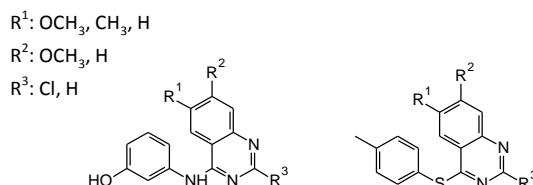
Kombinacja erlotinibu z silmitasertybem poprawia właściwości antyproliferacyjne względem linii komórek A431 (model nowotworu skóry) oraz H2170 (model raka płuc). Przy czym stosowanie wyłącznie silmitasertibu charakteryzuje się słabym efektem antyproliferacyjnym [87]. Na **rysunku 20** zaprezentowano przykład inhibitora CK2, którego budowę postrzegać można jako połączenie motywu chinazoliny z innym fragmentem strukturalnym poprzez wiązanie tioeterowe [88][89].

Rysunek 20. Inhibitory CK2. Dane cytotoksyczności względem różnorodnych linii komórkowych.

linia komórkowa	% inhibicji (1 μ M)
U251	58
SNB-75	85
SF-539	84
786-0	77
RXF 393	56
UO-31	53
MDA-MB-231	58
CCRF-CEM	69

Dokument patentowy [90] odnosi się do związków chemicznych zdolnych do modulowania kinazo-zależne ścieżki sygnałowe, szczególnie przekazywanie sygnału regulowane przez receptory KDR (VEGFR-2) oraz FLK-1 (VEGFR-1), odpowiedzialne w części za tworzenie się nowych naczyń krwionośnych (kapilar) oraz ich późniejszego wzrostu. Przykłady opatentowanych struktur inhibitorów FLK-1, opartych na rdzeniu chinazoliny, przedstawiono na **rysunku 21**.

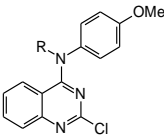
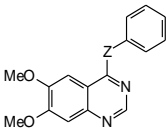
Rysunek 21. Inhibitory kinazy FLK-1. W zależności od podstawników wartość IC_{50} mieszczą się w przedziale 9,9 – 34,6 μ M



Na **rysunku 22** porównano aktywności związków zbudowanych w oparciu o szkielet chinazoliny i zróżnicowanemu sposobowi jego połączenia z innym fragmentem aromatycznym. Związek **EP128265** (syn: MPI-0441138), traci wysoką aktywność w wyniku zastąpienia grupy metylowej atomem wodoru przy atomie w pozycji 4-N [91]. Związek ten jest bardzo aktywnym efektem apoptozy (EC_{50} dla aktywacji kaspazy – 2 nM) oraz silnym inhibitorem proliferacji (GI_{50} – 2 nM) linii komórkowej T47D (model komórkowy raka piersi).

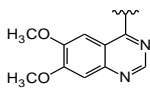
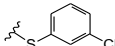
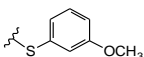
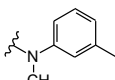
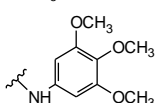
Powoduje także inhibicję polimeryzacji tubuliny i jest efektywny w komórkach z nadekspresją transportera ABC Pgp-1 (Glikoproteina z grupy transporterów wiążących ATP). Zauważyć można, że aktywność analogów 6,7-dimetoksy kształtuje się odmiennie. W tym przypadku korzystniejsza jest obecność grupy NH, atomu tlenu lub siarki. Obszerniejsza grupa metylowa może ograniczać możliwość kontaktu z białkiem lub wpływać znacząco na odmienną konformację cząsteczki.

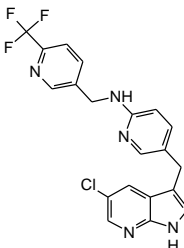
Rysunek 22. Aktywności podobnych strukturalnie związków opartych na szkielecie chinazoliny.

			
	T47D EC ₅₀ (nM)		EGFR IC ₅₀ (nM)
R: CH ₃ (EP128265)	2,0 ± 0,1	Z: NH	40
R: H	> 10	Z: NCH ₃	4000
		Z: O	20
		Z: S	40

Na **rysunku 23** przedstawiono struktury selektywnych inhibitorów receptorowej kinazy tyrozynowej CSF-1R, stymulującej kolonie makrofagów, należących do rodziny transbłonowych receptorów CSF1 (PDGF). Związki wykazują również aktywność hamującą kinazę Lck. Mogą oddziaływać z rodziną kinaz tyrozynowych Src [92]. Najaktywniejszą strukturą jest pochodna z grupą N-metylową. Rola fragmentu łączącego płaszczyzny chinazoliny z innym fragmentem strukturalnym wpływać więc może na profil aktywności inhibitora. Dla porównania umieszczono strukturę pexidartynibu, inhibitora CSF-1R znajdującego się w III fazie badań klinicznych w leczeniu barwnikowego kosmkowo-guzkowego zapalenia błony maziowej stawów (PVNS).

Rysunek 23. Inhibitory CSF-1R, oparte na szkielecie chinazoliny. Pochodne 4-amino oraz 4-sulfanylowe.

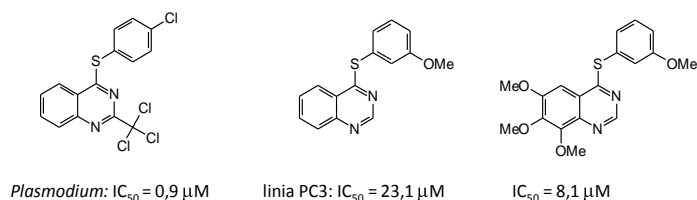
	rdzeń		Lck	CSF-R
			IC ₅₀ (nM)	
podstawniki			2500	3000
			5000	1000
			n.a.	180
			500	n.a.


Pexidartinib
 IC₅₀ = 22 nM

Rysunek 24 przedstawia różnorodnie podstawione 4-sulfanylochinazoliny. 4-Tiofenoksy-2-trichlorometylochinazoliny wykazują *in vitro* selektywną aktywność przeciw pasożytniczym pierwotniakom (*Plasmodium falciparum*) odpowiedzialnych za malarię u ludzi

[93]. Podobne układy mogą również wykazywać interesującą aktywność przeciwnowotworową względem modelu komórek raka prostaty PC3.

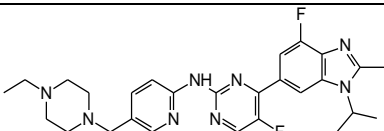
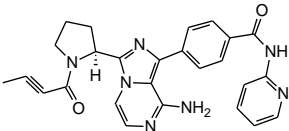
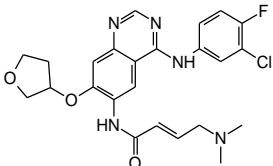
Rysunek 24. Struktury różnorodnie podstawionych 4-sulfanylochinazolin o działaniu przeciwpierwotniakowym i przeciwnowotworowym.



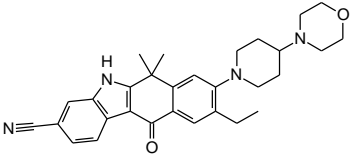
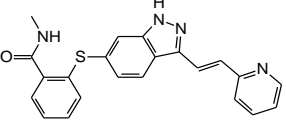
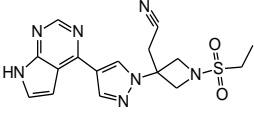
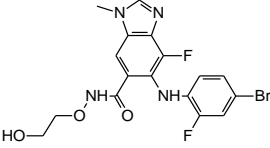
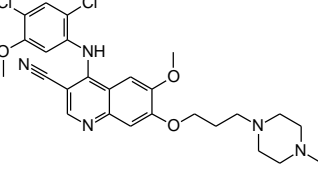
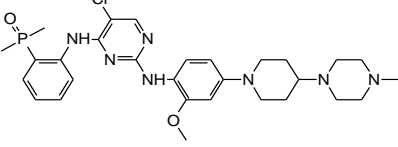
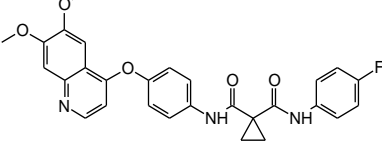
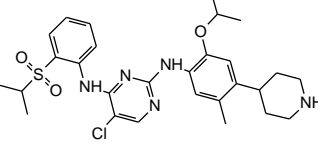
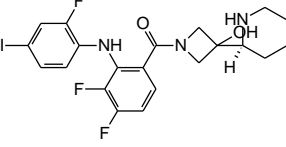
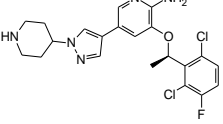
Stosowane w leczeniu inhibitory kinaz tyrozynowych¹

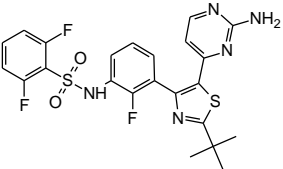
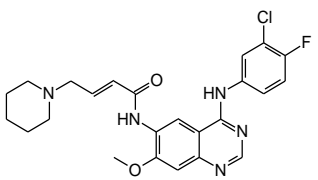
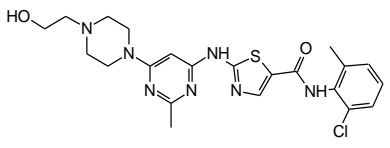
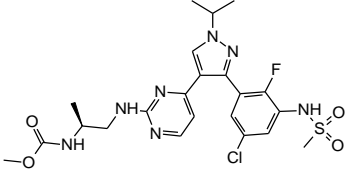
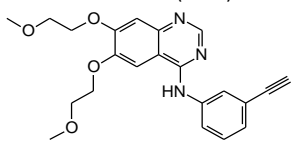
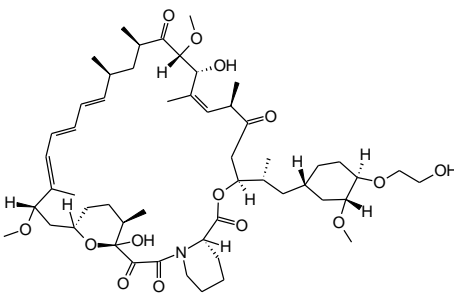
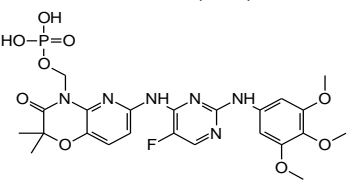
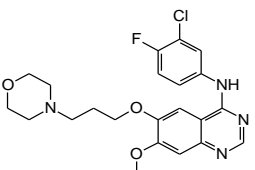
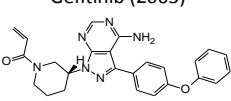
Analizując wzory strukturalne znanych inhibitorów kinaz tyrozynowych, stosowanych w terapiach celowanych, zauważyć można, że stanowią one w większości wielopłaszczyznowy układ zbudowany najczęściej na bazie pierścieni związków heterocyklicznych, połączonych w sposób liniowy. Często wśród wplecionych w łańcuch fragmentów strukturalnych, wyłonić można motyw mocznika, piperazyny, pirydyminy, linkerów sulfonamidowych i amidowych. Sugerować to może, że cząsteczki te wyłonione zostały na drodze projektowania wykorzystującego znane ligandy (FBDD). W tabeli zebrano struktury leków aktualnie zaakceptowanych do leczenia z wyszczególnieniem celu i wskazań użycia.

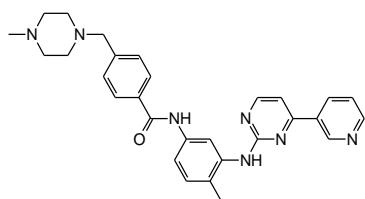
Tabela 4. Dopuszczone do leczenia przez FDA inhibitory kinaz tyrozynowych (2018).

Struktura i nazwa (rok rejestracji)	Cel molekularny	Wskazanie do leczenia
 <p>Abemaciclib (2017)</p>	CDK4/CDK6	Więcej niż 70 % przypadków pośród przypadków raka piersi z przerzutami jest typu HR+, HER2- (hormone receptor – positive, human epidermal growth factor receptor 2 negative)
 <p>Acalabrutinib (2017)</p>	BTK	Chłoniak z komórek płaszczu (Mantle cell lymphoma)
 <p>Afatynib (2013)</p>	EGFR, ErbB2, ErbB4	Niedrobnokomórkowy rak płuc (Non Small Cell Lung Carcinoma NSCLC)

¹ Inhibitory dopuszczone do leczenia przez amerykańską agencję do spraw leków FDA. Głównie jako leki przeciwnowotworowe.

	ALK, RET	ALK+, Dodatnia kinaza chłoniaka anaplastycznego, NSCLC
Alectinib (2015)		
	VEGFR1/2/3, PDGFRβ BCR-ABL1 T315 inna konformacja	Rak nerkowo – komórkowy (Renal cell carcinoma) RCC)
Aksytynib (2012)		
	JAK1/2	reumatoidalne zapalenie stawów (Rheumatoid arthritis)
Baricitinib (2018)		
	MEK1/2	Czerniak z mutacją punktową kinazy B-Raf V600E/K
Binimetinib (2018)		
	BCR-Abl, Src, Lyn, Hck	Przewlekła białaczka szpikowa (Chronic myelogenous leukemia CML)
Bosutinib (2012)		
	ALK, ROS1, IGF-1R, Flt3, EGFR	ALK+ Dodatnia kinaza chłoniaka anaplastycznego, Niedrobnokomórkowy rak płuc (NSCLC)
brigatinib (2017)		
	RET, Met, VEGFR1/2/3, Kit, TrkB, Flt3, Axl, Tie2, ROS1	Rdzeniowy rak tarczycy z przerzutami (Metastatic medullary thyroid cancer) , Rak nerkowo – komórkowy (RCC)
Cabozantinib (2012)		
	ALK, IGF-1R, InsR, ROS1	ALK+ NSCLC – lek pierwszej linii lub w wypadku tolerancji na crizotinib
Ceritinib (2014)		
	MEK1/2	Czerniak z mutacją punktową kinazy B-Raf V600E/K stosowany razem z vemurafenib
Cobimetinib (2015)		
	ALK, c-Met (HGFR), ROS1, MST1R	Rak ze zidentyfikowaną fuzją genu ROS1 kodującego kinazę tyrozynową ROS1 (ALK+ NSCLC oraz ROS1+)
Crizotinib (2011)		

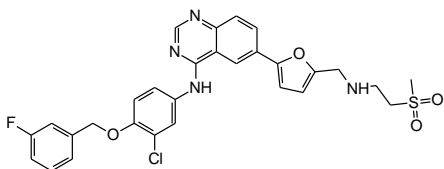
	B-Raf	Czerniak, NSCLC z mutacją BRAF
	EGFR/ErbB2/ErbB4	NSCLC spowodowane mutacjami EGFR
	BCR-Abl, Src, Lck, Yes, Fyn, Kit, EphA2, PDGFRβ	Ph+ (Philadelphia positive) CML - Przewlekła białaczka szpikowa lub (Acute Lymphoblastic leukemia – ALL) Ostra białaczka limfoblastyczna
	B-RafV600E/K	Czerniak z mutacjami B-RafV600E/K stosowany razem z binimetinib
	EGFR	NSCLC, rak trzustki
	FKBP12/mTOR	Nowotwór piersi, (human epidermal growth factor receptor 2, HER2–), Prymitywny guz neuroektodermalny (peripheral primitive neuroectodermal tumor PNET), RCC, Gwiaździak podwyściółkowy olbrzymiokomórkowy (subependymal giant cell astrocytoma SEGA)
	Syk, Spleen tyrosine kinase	Lek drugiej linii - Przewlekła małopłytkowość immunologiczna (chronic immune thrombocytopenia)
	EGFR	NSCLC
	Bruton tyrosine kinase	MCL, CLL, Waldenstrom's macroglobulinemia (macroglobulinemia).



Imatinib (2001)

BCR-Abl, Kit, PDGF

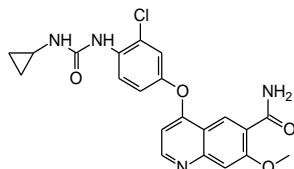
Ph+ CML lub ALL,
Agresywna układowa mastocytoza (aggressive systemic mastocytosis ASM),
Włókniakomięsak guzowaty skóry ,
(Dermatofibrosarcoma protuberans DFSP),
Zespół hipereozynofilowy (Hypereosinophilic syndrome HES),
Nowotwory podścieliskowe przewodu pokarmowego (Gastrointestinal stromal tumors GIST),
Mielodysplazja szpiku (Myelodysplastic syndrome MDS)



lapatinib (2007)

EGFR, ErbB2

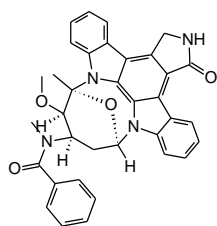
Rak piersi



Lenvatinib (2015)

VEGFRs, FGFRs,
PDGFR, Kit, RET

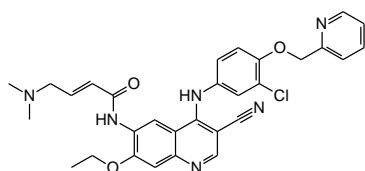
różnicujący się rak tarczycy



Midostaurin (2015)

Flt3

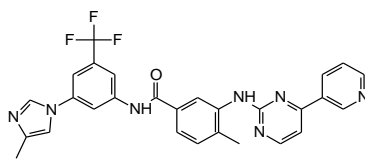
Ostra białaczka szpikowa (Acute myeloid leukemia) z mutacją Flt3



Neratinib (2017)

ErbB2/HER2

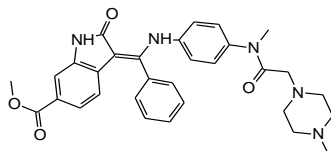
rak piersi (HER2+)



Nilotinib (2007)

BCR-Abl, PDGFR,
DDR1

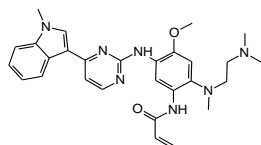
Ph+ CML



Nintedanib (2014)

FGFR1/2/3,
PDGFRα/β,
VEGFR1/2/3, Flt3

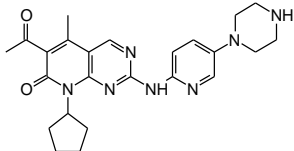
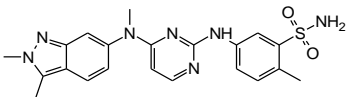
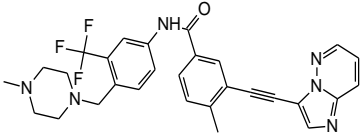
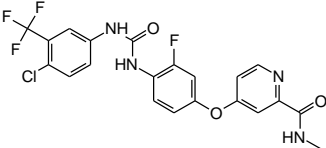
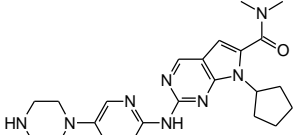
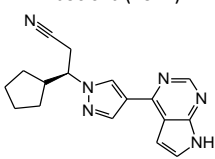
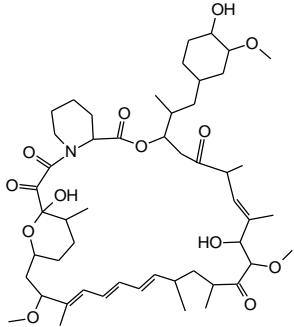
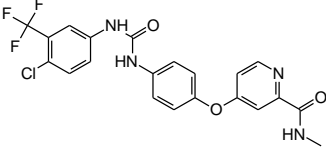
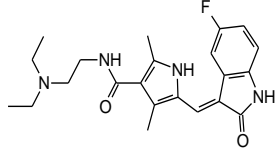
Idiopatyczne włóknienie płóc (Idiopathic pulmonary fibrosis)

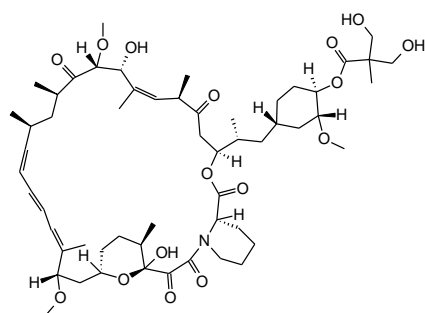


Osimertinib (2015)

EGFR T970M

NSCLC

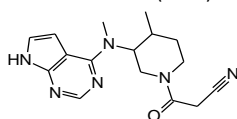
	CDK4/6	rak piersi (ER+ and HER2-)
	VEGFR1/2/3, PDGFRα/β, FGFR1/3, Kit, Lck, Fms, Itk	RCC, mięsaki tkanek miękkich
	BCR-Abl, BCR-Abl T315I, VEGFR, PDGFR, FGFR, EphR, Src family kinases, Kit, RET, Tie2, Flt3	Ph+ CML, ALL
	VEGFR1/2/3, BCR- Abl, B-Raf, B- Raf(V600E), Kit, PDGFRα/β, RET, FGFR1/2, Tie2, Eph2A	GIST
	CDK4/6	HR+-EGFR- metastatyczny rak piersi
	JAK1/2	Mielofibroza, czerwienica prawdziwa (polycythemia vera PV)
	FKBP12/mTOR	Przy transplantacji nerek, Limfangioleiomiomatoza (LAM)
	5B/C-Raf, B-Raf (V600E), Kit, Flt3, RET, VEGFR1/2/3, PDGFRβ	Rak wątrobowokomórkowy, RCC, DTC
	PDGFRα/β, VEGFR1/2/3, Kit, Flt3, CSF-1R, RET	RCC, GIST, PNET



Temsirolimus (2007)

FKBP12/mTOR

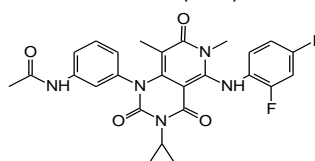
Zaawansowana postać RCC



Tofacitinib (2012)

JAK1/3

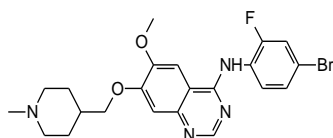
Reumatoidalne zapalenie stawów



Trametinib (2013)

MEK1/2

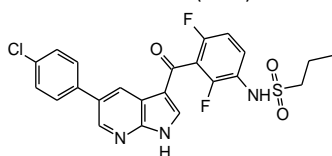
Czerniak,
NSCLC z mutacją BRAF



Vandetanib (2011)

EGFRs, VEGFRs,
RET, Brk, Tie2,
EphRs, rodzina
kinaz Src

Rdzeniowy rak tarczycy



Vemurafenib (2011)

A/B/C-Raf, B-Raf
(V600E), SRMS,
ACK1, MAP4K5, FGR

Czerniak z mutacją BRAFV600E,
choroba Erdheim-Chester

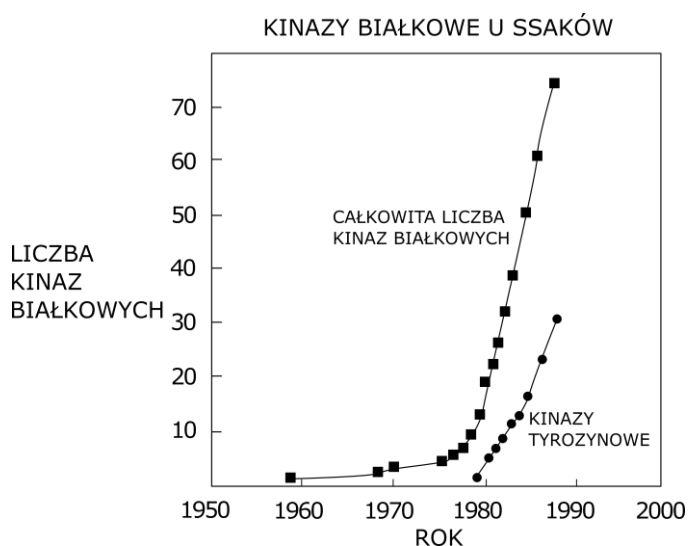
W literaturze najczęściej stosowana klasyfikacja inhibitorów kinaz tyrozynowych wyszczególnia cztery ich typy. Pierwszym z nich (typ I) określa związki współzawodniczące o miejsce aktywne z ATP, a kinaza przyjmuje konformację reprezentującą jej aktywny stan (DFG-in). Inhibitory typu II również współzawodniczą o miejsce aktywne, ale przy konformacji domeny DFG-out, czyli sytuacji w której cząsteczka może wykorzystać dodatkową przestrzeń z uwagi na translokację sekwencji DFG. Inhibitory typu III oraz IV wykorzystują dalsze, przyległe obszary względem miejsca wiążącego ATP. Uważa się je za inhibitory niekompetycyjne. Projektowanie *de novo* inhibitorów typu II jest problematyczne z uwagi na brak dostępu do odpowiednich struktur krystalograficznych. Inhibicję typu II odkryto przypadkowo. Otrzymany ko-kryształ imatynibu z kinazą ABL ujawnił odmienny sposób interakcji ligandu z białkiem niż to obserwowano do tej pory [94]. W przeciwieństwie do spodziewanej konformacji inhibitora o kształcie litery U, charakterystycznej dla inhibitorów typu I, dopasowujących się do konformacji DFG-in, imatynib wykrystalizował w konformacji podłużnej, w której fragment strukturalny benzamidu wypiera fenyloalaninę motywu DFG. Mimo wykorzystywania większej przestrzeni białka, inhibitory typu II niekoniecznie wykazują większą selektywność w porównaniu do inhibitorów pierwszego typu [95]. Bardziej uniwersalna klasyfikacja inhibitorów uwzględniać może wpływ na kinetyczne parametry

kinazy (k_{cat} , K_m). Inhibitory allosteryczne odkryte zostały głównie empirycznie i relatywnie niewiele znanych jest allosterycznych modulatorów kinaz [95]. Struktury dwóch prototypowych cząsteczek, GNF-2 oraz GNF-5, przedstawiono w kolejnym rozdziale.

Kinazy jako modulatory szlaków komórkowych

Główną funkcją kinaz jest ich zdolność do aktywacji szeregu innych białek efektorowych lub enzymów w obrębie swojej rodziny. Charakterystyczne jest występowanie tak zwanych kaskad przenoszenia sygnałów związanych z cyklem życiowym oraz podziałem komórki, w których bierze udział sieć kinaz białkowych. Ilość pozostających we wzajemnej relacji białek jest indywidualną cechą konkretnego szlaku sygnałowego. Białka sygnałowe zaangażowane są prawdopodobnie we wszystkie procesy metaboliczne, dlatego mogą stanowić potencjalnie wartościowy cel terapeutyczny. Wspólnym mianownikiem działania wszystkich kinaz jest ich zdolność do fosforylacji różnorodnych białek. W ten sposób regulowany jest metabolizm, podział, wzrost i różnicowanie komórek. Układy o wysokim stopniu skomplikowania są bardziej podatne na usterki, które prowadzić mogą do różnorodnych chorób, w tym do nowotworów. Jednocześnie, z uwagi na złożony charakter układów biologicznych, niełatwo kontrolować ich funkcje za pomocą jednej substancji. Szczególnie, że wszystkie kinazy mają jeden wspólny substrat którym jest ATP. Pierwszą wydzieloną i szczegółowo scharakteryzowaną kinazą była fosforylaza (phosphorylase kinase – PhK), aktywująca fosforylaze glikogenową, w celu uwolnienia glukozy-1-fosforanu z glikogenu. Dokonali tego Krebs, Graves oraz Fischer w 1950 roku [96][97][98]. **Wykres 1** ilustruje postęp w identyfikowaniu kinaz białkowych do 1987 roku. W roku 2002 opublikowano pracę w której zidentyfikowano 518 przypuszczalnych genów kodujących kinazy, co stanowi około połowę przewidywanej ich ilości [99].

Wykres 1. Ilość zidentyfikowanych kinaz białkowych do 1987 roku. Rysunek na podstawie [14]



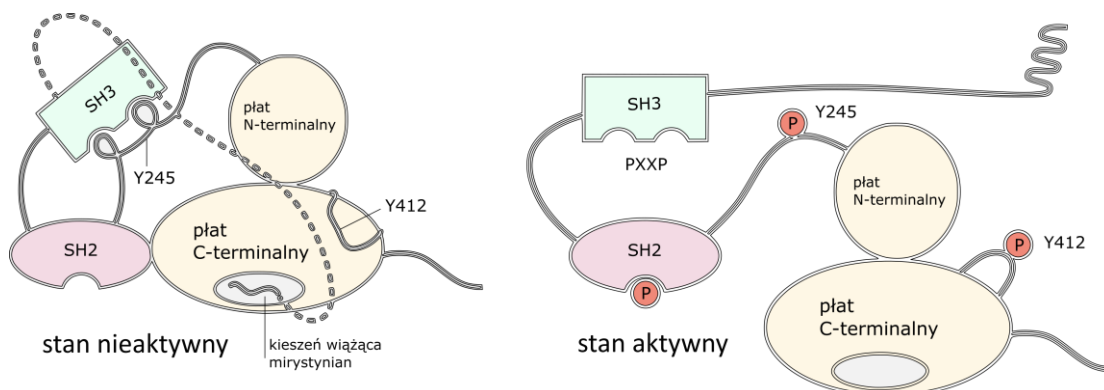
Konserwatywność budowy wśród kinaz nie jest zaskakująca, chociażby z uwagi na ich zdolność do katalizy tej samej reakcji hydrolizy ATP. Konserwatywne motywy strukturalne

rozdystribuowane są w obrębie całego białka i podzielić je można na obszar związany z katalizą oraz powierzchnię będącą informacją strukturalną dla kolejnych białek efektorowych. Różnice w budowie wpływać mogą na kinetykę reakcji hydrolizy [100] co uwidaczniać się może i w przypadkach punktowo zmutowanych białek. Zróżnicowanie szybkości katalizowanej reakcji przeniesienia grupy fosforanowej związana może być z potrzebą zróżnicowanej kontroli współistniejących mechanizmów regulowania procesów komórkowych. Szybkość reakcji hydrolizy nie musi przekładać się wprost na znaczenie poszczególnego białka w kaskadzie przenoszenia sygnału. W niektórych przypadkach aktywność kinazy można przeoczyć, jeżeli wykazuje ona bardzo dużą selektywność względem jednego substratu białkowego [101]. W terapii ważniejsze może więc być to, aby ustabilizować odpowiednio rozległy układ kinaz, tworzących jedną jednostkę sygnałową niż precyzyjne wyłączenie aktywności poszczególnego enzymu. W 1968 roku Walsh i Krebs, odkryli cAMP zależną kinazę białkową (PKA, kinaza serynowo-treoninowa). Później w latach 70 XX wieku, ugruntował się pogląd że białka mogą być fosforylowane również na resztach tyrozynowych. Kinazy tyrozynowe często spełniają rolę receptorów dla czynników wzrostu. Wiele z odpowiedzi komórkowych na czynniki wzrostu, których receptorami są kinazy tyrozynowe regulowane są poprzez fosforylację kinaz serynowych i treoninowych [102]. W 1977 roku, Nishizuka i współpracownicy odkryli kinazę białkową C (PKC), która odgrywa kluczową rolę w różnicowaniu szlaków pomiędzy przetrwaniem a śmiercią komórki [103][104]. v-Src jest genem zidentyfikowanym u wirusa mięsaka Rousa (Rous sarcoma virus), który koduje kinazę tyrozynową [105][106], kluczową w rozwoju tego nowotworu powstającego u kurczaków zarażonych wirusem. Onkogenny src wyzwała niekontrolowany wzrost w zmienionych chorobowo komórkach gospodarza. W zainfekowanych komórkach obserwuje się wyższy niż normalny poziom fosforylowanych reszt tyrozynowych, co wskazywać może na większą liczbę aktywowanych białek. v-Src jest jednocześnie pierwszym zidentyfikowanym onkogenem [106][107][108]. Kinaza Src jest pierwowzorem strukturalnym homologicznych kinaz tyrozynowych ze względu na podobieństwo budowy tych białek w obrębie całej rodziny. Co więcej, w 1980 roku Pawson wraz z zespołem odkryli konserwatywną strukturę białkową, składającą się średnio ze stu aminokwasów, przyległą do domeny kinazy Src, która stanowi interfejs komunikacyjny pomiędzy białkami, pełniąc również rolę auto - regulującą apoenzymu. Fragment ten nazwany domeną SH2 (Src homology 2) jest swego rodzaju anteną odbierającą zewnętrzne bodźce cytoplazmatyczne [109][110]. Praca Pawson'a nad interakcjami pomiędzy białkami zmieniła sposób postrzegania w jaki sposób komórki się komunikują oraz jak zmienia się przepływ sygnału w komórkach nowotworowych. Z jego pracy wynika, że białka mogą być zbudowane z modułów, które oddziałują w specyficzny sposób z innymi białkami efektorowymi. U kinaz nastąpiło bowiem rozdzielenie wykształconej funkcji katalizowania fosforylacji od zdolności do rozpoznawania molekularnego substratów białkowych. Kinazom towarzyszy również konserwatywny fragment białkowy SH3 (Src homology 3), składający się średnio z 60 aminokwasów. Pełni podobną funkcję jak fragment SH2.

Na **rysunku 26** zobrazowano mechanizm aktywacji kinazy stosując modułową reprezentację budowy kinazy ABL1. Rdzeń kinazy tyrozynowej połączony jest z modułami białkowymi SH2 oraz SH3. Ugrupowania fosfotyrozyny (Y245, Y412) działają jak przełączniki stanów aktywności z uwagi na zmieniającą się polaryzację oddziałujących ze sobą powierzchni. Fosforylacja reszt tyrozynowych następuje w wyniku funkcjonowania katalitycznej domeny kinazy, a więc na skutek przeniesienia grupy fosforanowej z cząsteczki ATP. Aberracja chromosomowa prowadząca do delecji domen SH2/SH3, lub fuzji domeny kinazy z z innym fragmentem prowadzić może do nieustannie aktywnej konformacji kinazy (niezdolnej do autoinhibicji). Głównie ze względu na to, że SH2 oraz SH3 poprzez zaczepy z płatem N-terminalnym oraz C-terminalnym, sprzęgają i kontrolują allosterycznie konformacje szkieletu rdzenia kinazy [111][99]. Zaczep C-terminalny zwieńczony jest fragmentem mirystynianu i znane są nieliczne inhibitory allosteryczne kinazy ABL1 (GNF-2, GNF-5), które wiążą się w szczelinie mirystynianowej.

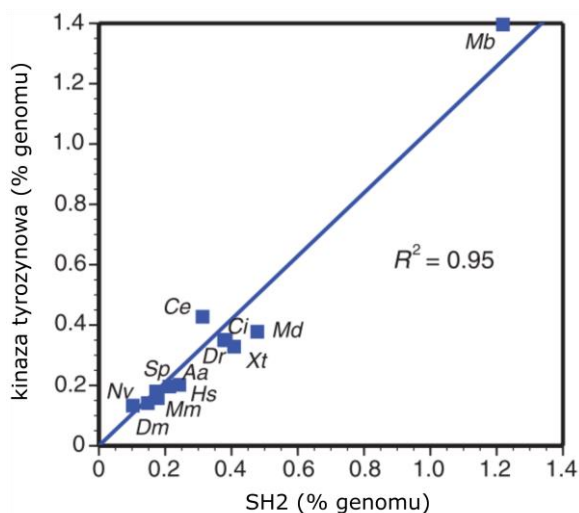
Rysunek 26. Schemat połączenia rdzenia kinazy z domenami regulacyjnymi SH2 oraz SH3.

Rysunek na podstawie [112].



Taki mechanizm kontroli rdzenia zauważyć można pośród różnorodnych gatunków. Co więcej, frakcja genomu zawierająca kod kinaz tyrozynowych koreluje w liniowy sposób z występowaniem domen regulacyjnych SH2. Zobrazowano to na **wykresie 2**.

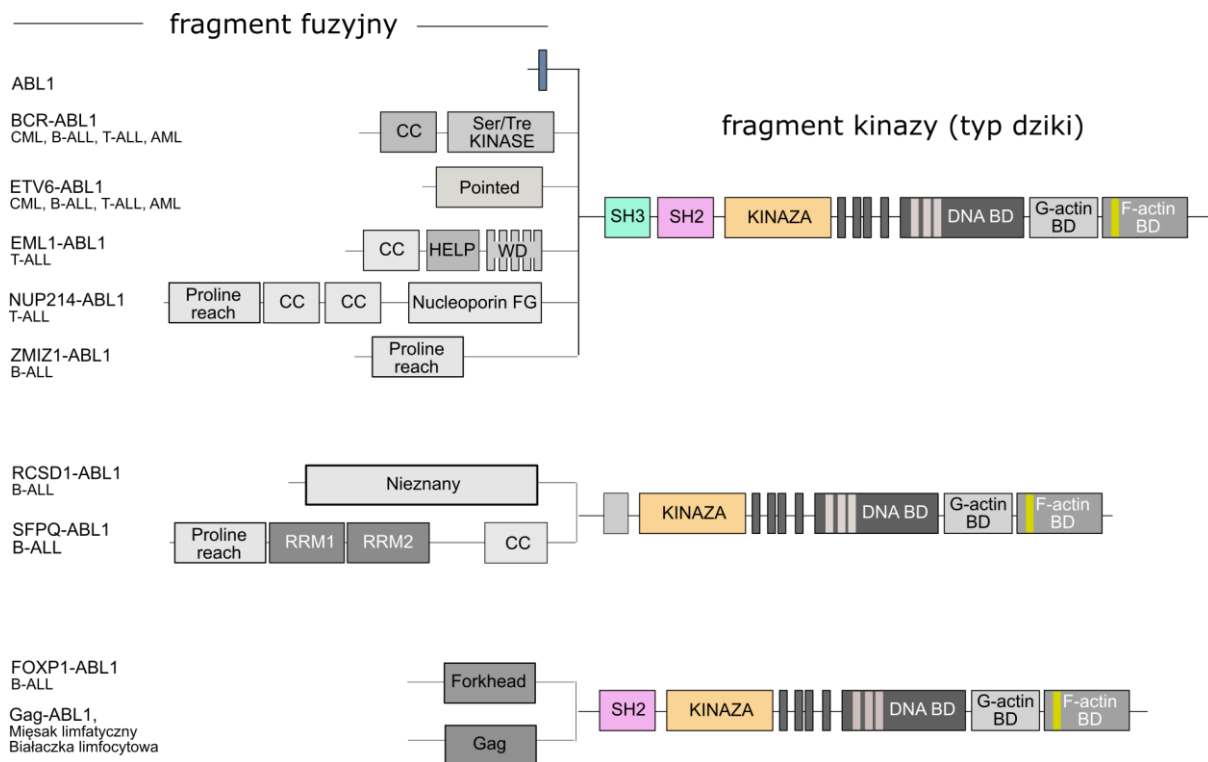
Wykres 2. Korelacja ilości występujących domen SH2 w kinomach różnych gatunków [113].



Mb – wiciowiec kołnierzykowy, jeden z najkrócej żyjących ze znanych organizmów; *Hs* – *Homo sapiens*; *Mm* – *Mus musculus* - mysz; *Md* – *Monodelphis domestica* - opos; *Dm* – *Drosophila melanogaster* – muszka owocówka; *Eh* – *Entamoeba histolytica* – ameba; *Sc* – *Saccharomyces cerevisiae* – pączkująca drożdż; *Dd* – *Dictyostelium dictyostelium* – śluzowiec; *Ag* – *Aedes gambiae* - komar

Obecność i prawidłowe funkcjonowanie domen SH2 oraz SH3 może być kluczowe dla utrzymania właściwej pracy układów sygnałowych. Gen fuzyjny *Bcr-ABL1* jest jednym z przykładów mutacji będącej aberracją chromosomową. Analizując **rysunek 31** zauważyć można, że fuzja może być wynikiem inkorporacji różnorodnych fragmentów białkowych, z zachowaniem lub delecją domen SH2/SH3 [114][115] i prowadzić może do różnorodnych form białaczek.

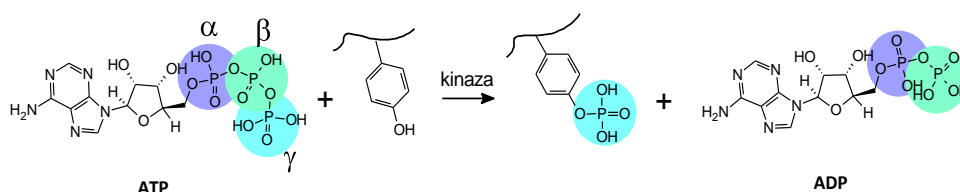
Rysunek 31. Zidentyfikowane geny fuzyjne kinazy ABL1. (CML: Przewlekła białaczka szpikowa; AML: Ostra białaczka szpikowa; B-ALL: Ostra białaczka limfoblastyczna). Rysunek na podstawie [115][116].



Mechanizm działania kinazy tyrozynowej

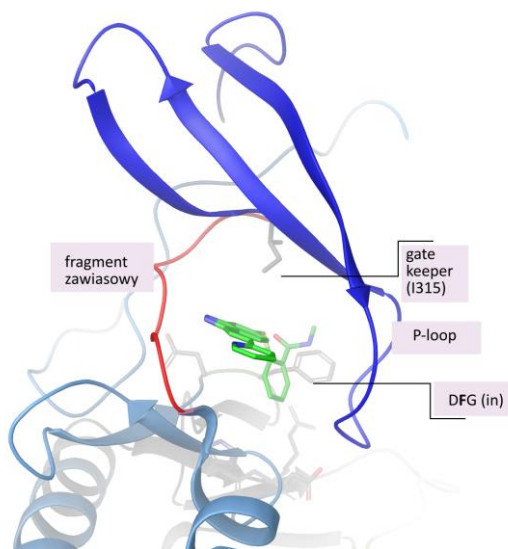
Kinazy stanowią rodzinę białek, które wykazują zdolność do katalizy reakcji transestryfikacji pomiędzy terminalnym (γ) fosforanowym fragmentem adenozy-5'-trifosforanu (ATP) a szeregiem substratów, takich jak hydroksylowe grupy funkcyjne aminokwasów (treoniny, tyrozyny, seryny), imidazolowy atom azotu histydyny, jak również cząsteczek tymidyny, ryboflawiny i fosfatydyloinozytolu.

Schemat 5. Schemat reakcji fosforylacji białek przy katalitycznym udziale kinazy tyrozynowej. Energia dysocjacji wiązań: (ΔH_{298} , kJ \cdot mol $^{-1}$) P-O, 596.6; CH₃-C₆H₅, 389; CH₃-Cl, 339.

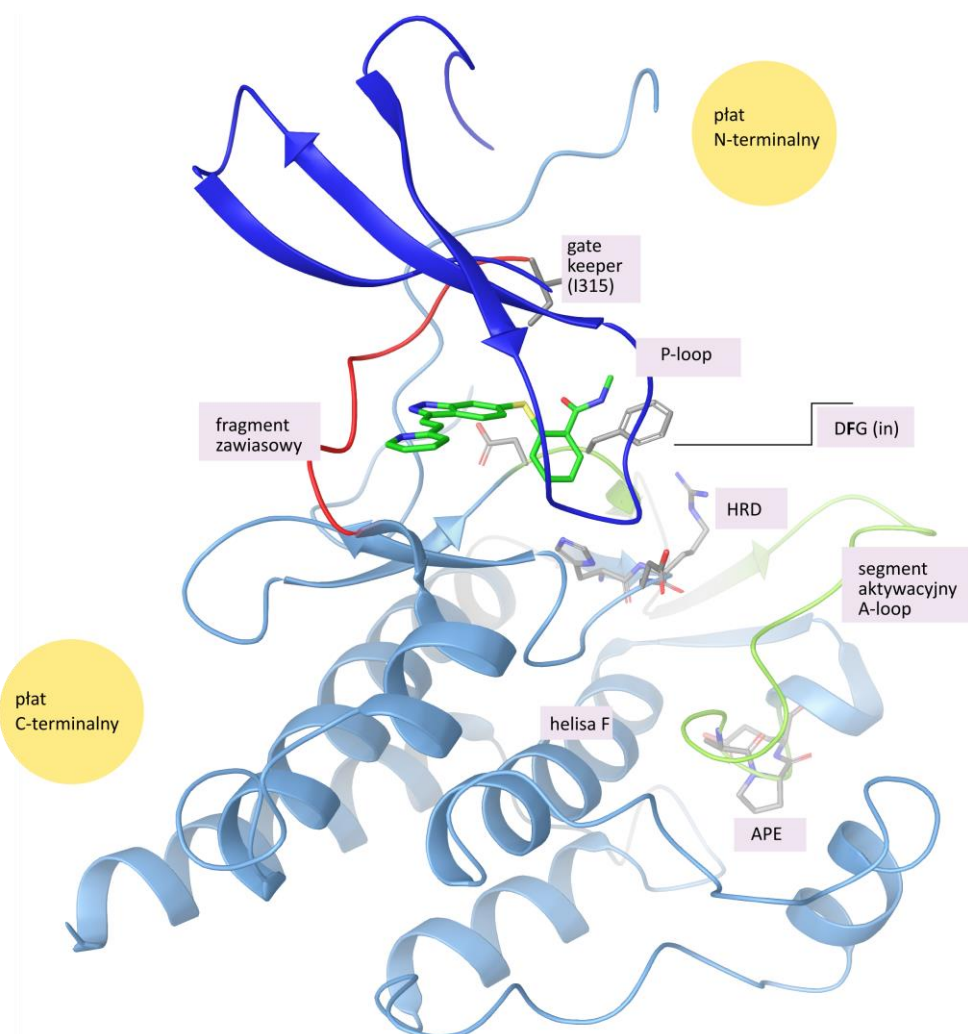


Prace prowadzone na chemicznym modelu transferu grupy fosforanowej wskazują, że reakcja tego typu przebiega bez zaznaczającego się produktu pośredniego, poprzez stan przejściowy analogiczny do aranżacji anionu metafosforanowego, a mechanizm ten jest podobny u wszystkich kinaz [100]. Wartość energii dysocjacji wiązania dla układu atomów fosforu i tlenu jest dużo wyższa niż dla typowych połączeń otrzymywanych w wyniku syntezy organicznej (np. wartość energii dysocjacji wiązania $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{--H}$ wynosi $377 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$). Dzięki temu reakcje fosforylacji możliwe są wyłącznie przy katalitycznym udziale enzymów. Fosforylowanie aminokwasów, będące modyfikacją potranslacyjną, poszerza wachlarz chemicznych indywiduów, które biorą udział w kształtowaniu zróżnicowanej struktury powierzchni białek [117]. Fosforylacja to jedna z najczęściej występujących reakcji chemicznych w żywym organizmie. Natura stosuje fosforylację do kodowania informacji genetycznej ($\text{DNA} \rightarrow \text{RNA} \rightarrow \text{białka}$), do zarządzania energią (w trakcie cyklu dobowego u człowieka przetworzeniu ulega około 40 kg ATP) oraz do regulacji procesów metabolicznych. Postuluje się nawet, że fosforan nie jest przypadkowo dobranym przez naturę fragmentem, modulującym procesy życiowe [118]. ATP pośrednio pełni funkcję donora fosforanu, będąc jednocześnie nośnikiem energii. Jego rola nie ogranicza się do regulowania procesów kinazozależnych. Zewnątrzkomórkowe ATP oddziałuje z transbłonowymi receptorami purynergicznymi. Pełni więc ważną rolę w funkcjonowaniu układu nerwowego. Bierze udział w przekazywaniu sygnałów bólowych poprzez sieć odpowiednich neuronów połączonych z nocyceptorami. Prawie każdy z aminokwasów w sekwencji kinazy odgrywa ważną rolę w funkcjonowaniu aparatu aktywacji i katalizy. Chociaż analiza ich mechanizmu działania powinna być analizowana jako konsekwencja ich współpracy, to niektórym fragmentom w sekwencji łańcucha poświęca się szczególną uwagę. Na **rysunku 29a oraz 29b** przedstawiono wstęgową reprezentację kinazy ABL1 (T315I), z ligandem w miejscu aktywnym (aksytynib) i zaznaczono najważniejsze motywy strukturalne, które jak się uważa sprawują w głównej mierze kontrolę nad pracą kinazy.

Rysunek 29a. Reprezentacja fragmentu kinazy ABL1 (T315I). Zaznaczono kluczowe motywy strukturalne biorące udział w pozycjonowaniu nukleotydu oraz inhibitorów. Wstęga granatowa: beta zakręt fragmentu P-loop; wstęga czerwona: obszar zawiasowy -hinge.



Rysunek 29b. Budowa kinazy BCR-ABL1^{T315I} w reprezentacji struktur drugorzędowych. Wyszczególniono ważne konserwatywne motywy strukturalne oraz aksytynib. (Rysunek na podstawie PDB ID: 4WA9). Wstęga granatowa: beta zakręt fragmentu P-loop; wstęga zielona: segment aktywacyjny; wstęga czerwona: obszar zawiasowy -hinge.

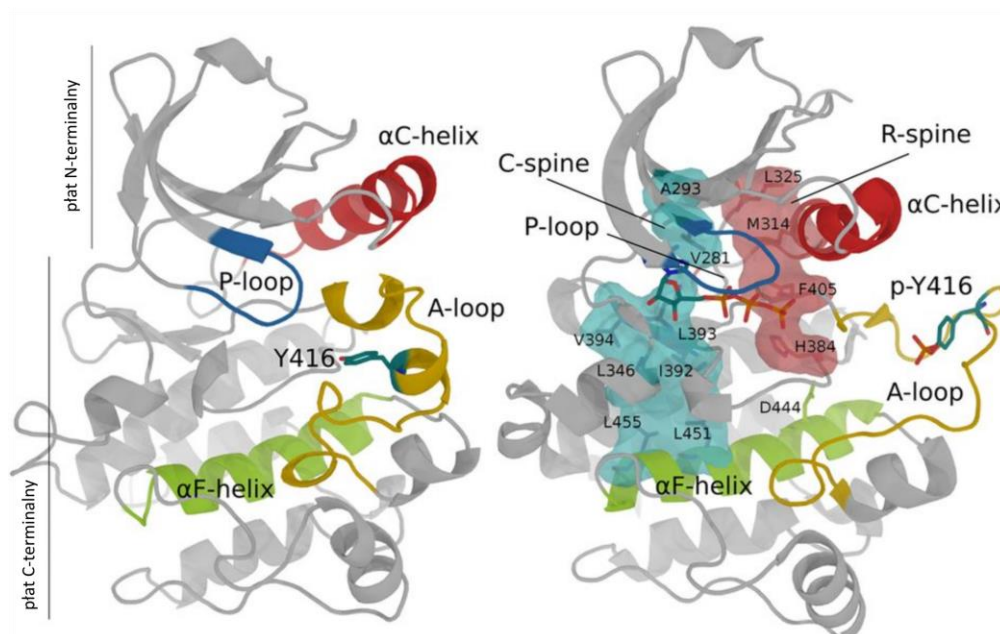


Sekwencja aminokwasów segmentu aktywacyjnego (oznaczonego kolorem zielonym) wiedzie poprzez trzy konserwatywne triady aminokwasów. Są to kolejno, podążając w kierunku płata C-terminalnego, DFG, HRD, APE. Pomiędzy sekwencjami DFG i APE znajdują się reszty tyrozynowe, substraty autofosforylacji. Co więcej, obecność tyrozyny w tym obszarze, otoczonej kwasowymi aminokwasami, jest typowym fragmentem rodziny kinaz tyrozynowych [119]. Podstawowa funkcja motywu HRD polega na jego udziale we właściwym pozycjonowaniu całego segmentu aktywacyjnego, a więc stabilizowaniu tworzącego się aktywnego stanu kinazy. Konserwatywny motyw HxD jest konieczny do utrzymania katalitycznej funkcji kinazy [120]. Segment aktywacyjny kinaz u eukariontów znajduje się w pobliżu miejsca katalitycznego. Większość kinaz aktywowanych jest w wyniku fosforylacji specyficznych aminokwasów w sekwencji segmentu aktywacyjnego. Fosfotyrozyna przeciwstawia się dodatniemu ładunkowi zlokalizowanemu na argininie w pętli katalitycznej motywu **HRD**. Kinazy tyrozynowe posiadają zazwyczaj jedną lub dwie tyrozyny w sekwencji segmentu aktywacyjnego. Fosforan zapewnia sieć mocnych wiązań wodorowych oraz elektrostatycznych oddziaływań sprzęgających segment z pozostałymi elementami

tworzącymi miejsce katalityczne oraz z interfejsem wiążącym substrat [121][122][123][124]. Reorganizacja strukturalna poprawia zdolność rozpoznawania i wiązania substratów peptydowych [125][126][127][128][129].

Przejście pomiędzy aktywną a nieaktywną katalitycznie formą jest rezultatem złożonych reorganizacji co najmniej dwóch konserwatywnych motywów strukturalnych: sekwencji Asp-Phe-Gly (DFG), oraz alfa helisy-C [130][123]. Zmiana konformacyjna prowadzi w konsekwencji do pełnego ustrukturyzowania dwóch hydrofobowych rdzeni (rdzenia regulacyjnego R-spine oraz katalitycznego C-spine), umożliwiając dostęp substratom do obszaru wiążącego ATP [125][131][132], znajdującego się na interfejsie pomiędzy płacami białka. Cały proces inicjowany i kontrolowany jest poprzez różne mechanizmy, a najczęściej występuje poprzez fosforylację reszt tyrozynowych zlokalizowanych w sekwencji pętli aktywacyjnej (**rysunek 29c**).

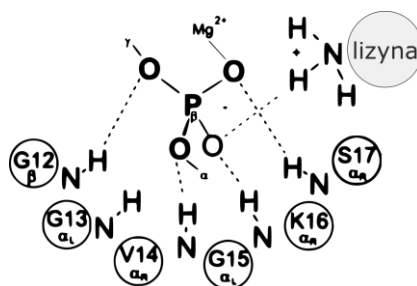
Rysunek 29c. Mechanizm integracji hydrofobowych rdzeni strukturalnych R-spine oraz C-spine. Fosforylacja reszty tyrozyny (Y416) oraz wiązanie nukleotydu zmienia konformację białka. Na przykładzie kinazy Src.



Wiązanie nukleotydu

Projektowane w tej pracy inhibitory powinny, zgodnie z oczekiwaniami, oddziaływać z kinazami w miejscu aktywnym, wiążącym endogennie ATP. Miejsce to tworzą motywy strukturalne rozlokowane w różnych miejscach sekwencji, które jednak potrafią się komunikować w zharmonizowany sposób, zapewniając niezbędne ugrupowania do przeniesienia ugrupowania fosforanu. Kinazy białkowe u eukariontów (EPK) należą do rodziny białek wiążących nukleotydy. Zazwyczaj ATP-wiążące proteiny zawierają konserwatywne motywy strukturalne Walkera (A oraz B) odkryte przez Walkera i współpracowników w 1982 roku [133]. Fragment A jest bogaty w aminokwas glicynę i najczęściej zdefiniować go można poprzez sekwencję **G-XXXX-GKT/S**. Sekwencja ta tworzy gniazdo lokujące grupę fosforanową, a grupy atomów NH zwrócone są do jego wnętrza (**rysunek 29d**).

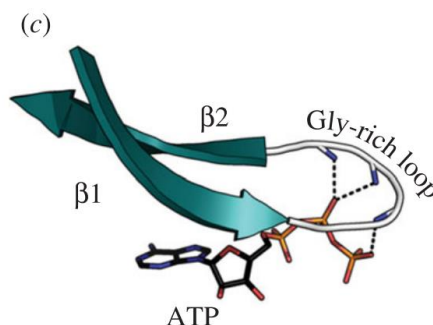
Rysunek 29d. Motyw gniazda wiążącego anion fosforanowy nukleotydu (Walker A, RAS^{p21} PDB: 5p21).



Gniazda tego typu są wrażliwe na niewielkie zmiany strukturalne substratów i wykazują właściwości dyskryminujące enancjomery [134]. Grupa fosforanowa nukleotydu jest skoordynowana do dwuwartościowego kationu takiego jak jon magnezu, wapnia lub manganu [135]. Konserwatywna lizyna (donor ładunku dodatniego) w sekwencji motywu Walkera A, wspólnie z grupami atomów NH głównego łańcucha, tworzy niezbędne oddziaływanie wiążące nukleotyd [136]. Funkcjonalność motywu Walkera A będącego fragmentem białka odpowiedzialnego za interakcję z fosforanem ATP [137][138] jest jedną z najczęściej występujących podstruktur peptydowych, zaangażowanych w wiązanie β -fosforanu cząsteczki nukleotydu. Stanowi tym samym część kompleksu katalitycznego układu hydrolizującego.

Kinazy białkowe wyróżniają się na tle innych protein wiążących ATP pod względem rodzaju aminokwasów i sposobu ich aranżacji wokół wiążanego nukleotydu [101][137], stanowiącym charakterystyczny motyw strukturalny bogaty w glicynę (P-loop - phosphate binding loop). Znajduje się on pomiędzy pasmami $\beta 1$ oraz $\beta 2$, tworząc tzw. motyw szpilki do włosów (hairpin motif), (**rysunek 29e**).

Rysunek 29e. Motyw gniazda wiążącego anion fosforanowy nukleotydu: P-loop (glycine-rich-loop) kinazy PKA.



Pętla zawija się nad nukleotydem, przykrywając pierścień adeniny, i pozycjonuje γ -fosforan ATP odpowiednio do reakcji katalizy. Jest to najbardziej elastyczny fragment płata N-terminalnego. Wierzchołek pętli jest w pełni zamknięty tylko wtedy gdy jej łańcuch aminokwasów jest przywiedziony do fosforanu, tworząc potrójny kompleks [139]. Motyw można zdefiniować jako sekwencja rodzaju **GxGxxG** (obszar bogaty w glicynę). Kolejnym ważnym motywem jest sekwencja **AxK**, znajdująca się w pasmie $\beta 3$ przyległym do fragmentu P-loop. Lizyna w sekwencji tego motywu łączy fosforan ATP z alfa helisą C, która pełni rolę

mechanizmu synchronizacyjnego poszczególnych modułów białka (**rysunek 27c**) [140]. Zawiera konserwatywny kwas glutaminowy, który tworzy pomost z lizyną w motywie AxK. Mostek solny Lizyna-kwas glutaminowy jest charakterystycznym motywem konserwatywnym wśród całej rodziny kinaz białkowych. Jego obecność często postrzegana jest jako cecha stanu aktywnego. Dla kinazy BCR-ABL1^{T315I} cała ta konserwatywna sekwencja wygląda następująco: **G²⁴⁹GGQYGEVYEGVWKKYSLTVAVK²⁷¹**.

Reszta kwasu asparaginowego, znajdującego się w konserwatywnej sekwencji **DFG**, bierze pomocniczo udział przy pozycjonowaniu jonu Mg²⁺, a reszta kwasu glutaminowego jest niezbędna dla hydrolizy ATP [136], poprzez aktywację cząsteczki wody a następnie jej atak nukleofilowy na γ-fosforan cząsteczki ATP [141][142][143]. Mutacje punktowe reszty glutaminianowej blokują reakcję hydrolizy, ale nie wiązanie się nukleotydu. Wysoce elastyczny fragment P-loop (glycine-rich-loop) (BCR-ABL1: aminokwasy 248–257), może kontrolować dostęp inhibitora do miejsca wiążącego poprzez zmianę swojej konformacji [144][145]. Znane są mutacje w sekwencji wpływające znacznie na dynamikę pętli, co rzutuje na punkt równowagi pomiędzy aktywną i nieaktywną formą białka [146]. Szczegółowe analizy sekwencji i struktury mutantów o zmienionej budowie kieszeni wiążącej ATP potwierdzają, że wymiana aminokwasów w motywach wiążących fosforan nie jest dobrze tolerowana z uwagi na utrzymanie właściwości katalitycznych reakcji hydrolizy (aktywność ATPazy). Przykładowo, wymiana lizyny na argininę wyłączyła zdolności katalityczne, choć zdolność do wiązania ATP została zachowana [147][148]. Z tego wynika, że nie tylko elektronowa stabilizacja stanu przejściowego jest istotna, ale również utrzymanie geometrii całego układu [149]. Mutacje mogą przykładowo prowadzić do utraty dwóch wiązań wodorowych, stabilizujących nieaktywną formę aranżacji wokół inhibitora. W **tabeli 5** zestawiono wartości IC₅₀ imatynibu względem szeregu mutantów [150][151]. Więcej zestawień aktywności inhibitorów z typami mutacji punktowych kinazy BCR-ABL1 odnaleźć można w pracy przeglądowej [152], w której opisano także przyczyny molekularne takiego stanu rzeczy.

Tabela 5. Zestawienie mutacji punktowych we fragmencie P-loop z aktywnością imatynibu i porównanie względem mutacji innych fragmentów kinazy.

IC ₅₀ (μM)	Białko ABL1 oraz jego mutacje	
0.17	ABL1 WT	
0.23	BCR-ABL1 ^{WT}	
6.7	Glu255Lys	
> 10	Tyr253His	
6.99	Tyr253Phe	P-loop
3.0	Gly250Glu	
16.88	BCR-ABL1 ^{T315I}	<i>gatekeeper</i>

Aktywacja kinazy

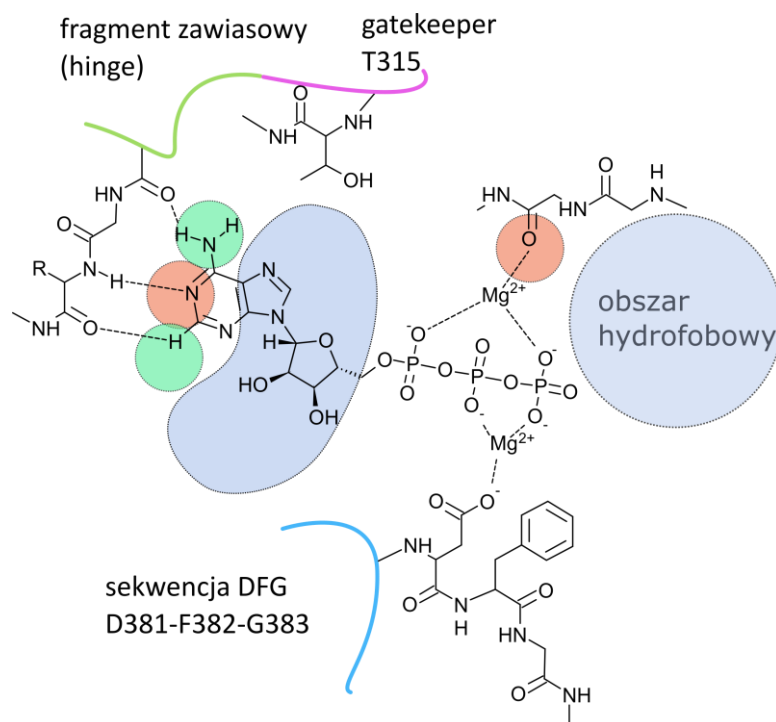
Na architekturę kinazy białkowej można spojrzeć jak na maszynę zbudowaną z modułów, wśród których odnaleźć można specjalizację w pełnionej przez siebie funkcji podzespoły. Za współpracę tych modułów w zsynchronizowany sposób odpowiedzialna jest α F-helisa, stanowiąc centralę pozycjonującą kluczowe fragmenty modułów odpowiedzialnych za katalizę i regulację [153].

Dzięki zastosowaniu metody LSP (local spatial patterns alignment) otwiera się możliwość głębszego spojrzenia w wewnętrzne mechanizmy regulujące pracę kinazy. Odległe fragmenty białka komunikują się poprzez sieć wiązań wodorowych i hydrofobowych interakcji [154][155]. Z punktu widzenia projektowania inhibitorów istotne jest, jak oddziałują one na formowanie się rdzenia regulacyjnego R-spine oraz katalitycznego C-spine. Zostają zintegrowane w czasie reakcji przeniesienia grupy fosforanowej (**rysunek 27c**), stanowiąc konserwatywny mechanizm regulacyjny kinaz u eukariontów [155][154]. Stopień ich uformowania przekłada się na poziom aktywności enzymu [101][156][157]. Ich aranżacja angażuje w skoordynowany sposób translację domen funkcjonalnych białka. Między innymi α C-helisę, nić β 4, fenyloalaninę motywu DFG, histydynę motywu HRD oraz α F-helisę [122][158][130][123]. Cały proces dynamiki pomiędzy poszczególnymi konformacjami białka stanowi swego rodzaju efekt domino, a inicjowany jest w wyniku fosforylacji jednego aminokwasu – tyrozyny - w przypadku kinaz tyrozynowych. Onkogenne kinazy mogą wykazywać preferencje do ustrukturyzowania tych rdzeni, z pominięciem etapu fosforylowania. Natomiast mutageneza jakiegokolwiek reszty tworzącej R-spine prowadzi do nieaktywnej kinazy.

Fragment DFG

Ważnym konserwatywnym fragmentem strukturalnym u kinaz jest sekwencja DFG (kwas asparaginowy – fenyloalanina – glicyna), a jego konformacja stanowi rodzaj przełącznika pomiędzy aktywną a nieaktywną katalitycznie formą białka. Wyszczególnia się jej dwa położenia. DFG-in ustala się po związaniu ATP w miejscu aktywnym kinazy. Fenyloalanina stabilizuje kompleks a reszta kwasu asparaginowego bierze udział w pozycjonowaniu jonu Mg^{2+} względem atomów tlenu grup fosforanowych ATP (**rysunek 29e**).

Rysunek 29e. Zbliżenie na fragment zawiasowy białka ABL1 WT oraz jego konserwatywne motywy strukturalne – *gatekeeper* oraz DFG w ujęciu sposobu interakcji z nukleotydem.

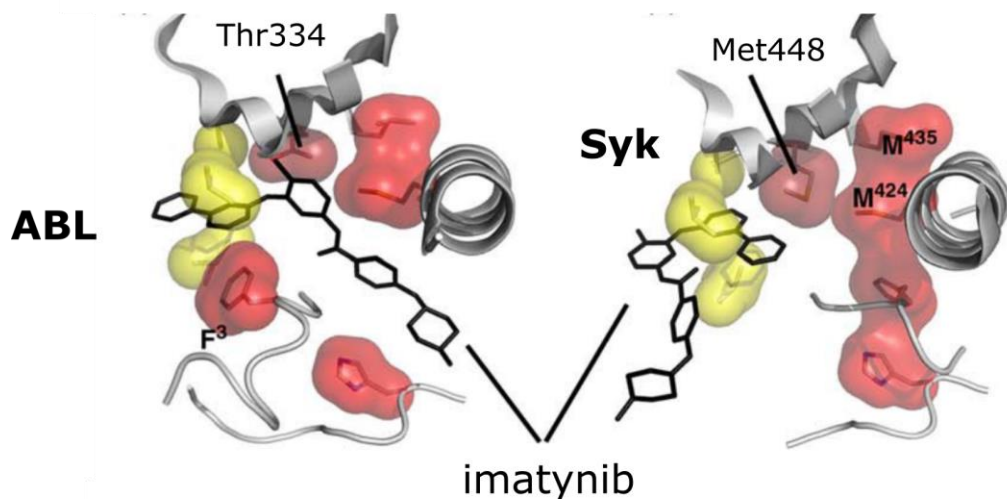


DFG-out, obecna typowo w nieaktywnej formie kinazy, blokuje sterycznie wiązanie się ATP. Z tego też względu do w takiej konfiguracji białka wiążą się inhibitory niewspółzawodniczące z ATP. Poszczególne kinazy wykazują zróżnicowaną preferencję do jednego z dwóch granicznych stanów DFG. Przykładowo równowaga kinazy Src przesunięta jest znacząco w stronę stanu DFG-out, w przeciwieństwie do kinazy ABL1, która występuje głównie w aktywnej formie, a więc w konformacji DFG-in [159]. Fragment DFG-out jest jednoznacznie rozpoznawalny jako nieaktywna forma białka.

Fragment zawiasowy oraz *gatekeeper*

Fragment zawiasowy to elastyczny łańcuch peptydowy (BCR-ABL1: aminokwasy 315 – 326), łączący dwa płaty białka [146]. Uczestniczy aktywnie w indukowanym dopasowaniu się ligandów. Charakteryzuje się wysoką hydrofobowością, tworząc zazwyczaj układ wiązań wodorowych z inhibitorem [160][146][161]. Ważną rolę w dynamice kinazy białkowej odgrywa tak zwany *gatekeeper* [162], który znajduje się pomiędzy motywami strukturalnymi C-spine (rdzeń katalityczny) oraz R-spine (rdzeń regulacyjny). Przedstawia to **rysunek 29f** [163]. Badania ludzkiego kinomu ujawniają, że 77 % kinaz posiada relatywnie duże fragmenty *gatekeeper* (Leu, Met, Phe). Natomiast 21 % kinaz, głównie tyrozynowych, posiada mniejsze reszty (Thr, Val) [164]. Mutacje punktowe polegające na wymianie reszty *gatekeeper* (znajdującej się w sekwencji hinge region) mogą w konsekwencji stać się przyczyną osłabienia lub wyeliminowania interakcji z inhibitorem [165].

Rysunek 29f. Reszta *gatekeeper* bierze udział w formowaniu się konserwatywnego motywu strukturalnego R-spine, pełniącego regulacyjną rolę w transformacji pomiędzy aktywnym i nieaktywnym stanem kinazy (PDB ID 1XBB).



W kinazie ABL, *gatekeeper* stanowi mały aminokwas treonina (sposób numeracji zależy od struktury krystalograficznej Thr315 jest tożsame z Thr334 na rysunku 28), która nie jest efektywnym stabilizatorem motywu R-spine. Rdzeń ulega rozłączeniu w trakcie dezaktywacji kinazy a sekwencja DFG kieruje się do zewnątrz względem miejsca aktywnego, tworząc większą przestrzeń w której może wiązać się cząsteczka imatynibu (obrazek na podstawie PDB ID: 1OPJ). Wymiana treoniny na aminokwas izoleucynę lub metioninę może zablokować rdzeń R-spine w aktywnej konformacji. Na drugim rysunku przedstawiono kinazę Syk. Posiada ona *gatekeeper* metioninę (Met448) a dodatkowo oba aminokwasy rdzenia R-spine to metioniny. (Met435, Met424) związane są z *gatekeeper*. Układ ten stabilizuje R-spine, prowadząc do odmiennego, nieefektywnego wiązania się imatynibu w porównaniu do ABL^{WT}. Można to wytłumaczyć różnorako, jednakże te większe aminokwasy (szczególnie metionina) stabilizują efektywniej R-spine niż treonina, przesuwając równowagę w stronę aktywnej konformacji [166]. Taka stabilizacja w połączeniu ze sterycznym osłanianiem [167] miejsca aktywnego blokuje imatynib, i w konsekwencji promuje nieustającą aktywność onkogennej kinazy. W najczęściej spotykanym scenariuszu, aminokwas o mniejszym łańcuchu bocznym (jak treonina) jest zastąpiony większym, hydrofobowym fragmentem takim jak metionina lub izoleucyna.

W tabeli 6 sklasyfikowano *gatekeeper* zawarte w kinomie. Metionina składa się z długiego, ale elastycznego łańcucha i została zaklasyfikowana jako reszta o średnim rozmiarze M. Rodzaj obecnej reszty *gatekeeper* można wykorzystać w celu zaprojektowania bardziej specyficznego liganda.

Tabela 6. Dystrubucja reszt *gatekeeper* w kinomie (420 ściśle powiązane sekwencje kinazy) [164].

<i>Gatekeeper</i>	Liczba kinaz	%	Rozmiar (S, M, L)
Gly	1	0.24	S
Ala	1	0.24	S
Ser	3	0.71	S
Cys	2	0.48	S
Thr	76	18.10	S
Val	13	3.10	S
Ile	9	2.14	M
Leu	72	17.14	M
Met	169	40.24	M
Gln	8	1.90	M
Phe	63	15.00	L
Tyr	3	0.71	L

Aminokwasy te wyznaczają umowną granicę, dzielącą przestrzeń miejsca aktywnego na obszar w którym oddziałują inhibitory typu I od przestrzeni zajmowanej dodatkowo przez inhibitory typu II. Dodatkowa przestrzeń dostępna jest tylko w wypadku nieaktywnej formy kinazy, którą *gatekeeper* może stabilizować. Dodatkowe oddziaływania mogą być źródłem wyższej selektywności w rozpoznawaniu molekularnym [146][160]. Więcej oddziaływań może zapewnić cząsteczce inhibitora efektywne wiązanie nawet w wypadku mutacji na skutek której zmienia się w sekwencji aminokwas pełniący rolę *gatekeeper* [165][168][169][170][171][172], chociaż imatynib nie rozpoznaje zmutowanych białek ABL1. Również inhibitory typu I są czułe na mutacje tego typu, ponieważ *gatekeeper* tworzy powierzchnię miejsca aktywnego u kinaz. Analizując dane w **tabeli 7** zaobserwować można trend, że mutacje punktowe skutkujące zmianą aminokwasu *gatekeeper* związane są w wielu przypadkach z wymianą treoniny na izoleucynę lub treoniny na metioninę.

Tabela 7. Typowe mutacje zidentyfikowane u różnych kinaz.

ABL1	T315I /F/D/N
EGFR	T790M (T766M)
BRK	T264M
c-SRC	T341M
FYN	Y531H
c-kit	T670I /E
PDGFR	T674I
Cdk2	F80G
p38	T106M

Podsumowując, należy zaznaczyć, że *gatekeeper* jest jednym z elementów tworzących fragment strukturalny R-spine. Zazwyczaj projektowanie inhibitorów rozpatruje się w kontekście lokalnego ich oddziaływania w miejscu aktywnym enzymu. Spojrzenie na przykład imatynibu związanego z kinazą ABL1^{WT} pokazuje z szerszej perspektywy, że cząsteczka inhibitora powoduje rozerwanie motywu strukturalnego R-spine. Natomiast mutacja T315I powoduje jego samoistną aranżację indukując transformację w onkogeną kinazę. Translacja sekwencji DFG w stronę konformacji DFG-out rozrywa integralność rdzenia regulującego R-spine [173]. Za jego stabilizację odpowiada w szczególności interakcja z fragmentem fenyloalaniny [174][175].

Aksytynib wykazuje powinowactwo względem szerokiego spektrum mutacji punktowych *gatekeeper* kinazy BCR-ABL, jednocześnie jego aktywność względem typu dzikiego jest niższa [176]. Racjonalnie projektowana struktura aksytynibu celowana była w kinazy VEGFR1/2/3, PDGFR β a dopiero przypadkowo wykazała bardzo wysoką aktywność hamującą BCR-ABL^{T315I}. W tabeli 8 zestawiono wartości IC₅₀ dla aksytynibu względem szeregu mutantów BCR-ABL1, wobec których wykazuje większe powinowactwo niż dla białka typu dzikiego. Sytuacja taka może być hipotetycznie korzystniejsza *in vivo*, z uwagi na to, że nadekspresja zmutowanych form białka w wyniku hamowania enzymów typu dzikiego, prowadzić może do wzmożonej progresji nowotworu.

Tabela 8. Aktywność aksytynibu względem izoform kinazy BCR-ABL1.

Mutacja	linia komórkowa Ba/F3 IC ₅₀ (nM)
V299L	236
T315V	45
T315I	98-146
T315A	389
T315L	201
T315M	736
WT	811

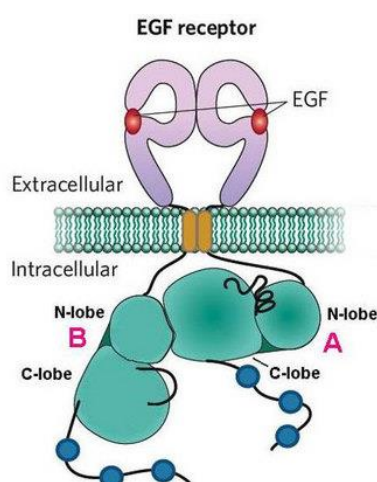
Szlaki sygnałowe

Wczesny wzrost organizmu charakteryzuje się wzmożoną proliferacją zarodkowych komórek macierzystych, które w procesie różnicowania tworzą wyspecjalizowane typy komórek, odpowiedzialnych za tworzenie właściwych tkanek oraz organów u organizmów wielokomórkowych. W trakcie różnicowania się komórek, ich szybkość proliferacji zazwyczaj spada i większość komórek u dojrzałych organizmów zatrzymuje się w fazie G₀ cyklu. Kilka typów komórek zróżnicowanych nie dzieli się więcej (np. mięsień serca), lecz większość jest zdolna do ponownej proliferacji. Proces ten potrzebny jest w celu zastąpienia komórek uszkodzonych lub obumarłych. Niektóre komórki dzielą się w sposób nieprzerwany w ciągu życia organizmu i zastępują komórki które wykazują wysoki stopień ich wymiany u dojrzałych organizmów. Proliferacja komórkowa jest więc starannie zrównoważonym procesem, koniecznym dla uzupełnienia odpowiedniej ilości obumarłych komórek w tkankach organizmu. Reprezentatywnym przykładem komórek macierzystych wykazujących nieustanną proliferację są różnicujące się komórki krwi. Ich cykl życiowy jest krótki, waha się od dni do miesięcy, a ich ubytek uzupełniany jest ciągle poprzez podział komórek z możliwością wielokierunkowego różnicowania się (hematopoezy). Wyjaśniać to może także to, że nowotwory krwi są jednymi z najczęściej występujących, natomiast nowotwory mięśnia sercowego występują tylko jako efekty przerzutu nowotworów tkanek miękkich (mięsak).

Inicjacja procesu wzrostu rozpoczyna się od interakcji czynników wzrostu z ich specyficznymi receptorami, zlokalizowanymi na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej. Do czynników wzrostu zalicza się między innymi insulinę, płytkopochodny czynnik wzrostu

(PDGF), naskórkowy czynnik wzrostu (EGF/HER). Na **rysunku 30** przedstawiono w sposób modułowy kinazę EGFR, która związała się ze swoim substratem EGF. Tworzenie kompleksu zmienia charakterystykę strukturalną wewnątrzkomórkowego fragmentu receptora, który wykazuje taką funkcję jak rdzeń niereceptorowej kinazy tyrozynowej. Natomiast funkcję domeny zewnątrzkomórkowej postrzegać można podobnie do roli domen regulacyjnych SH2/SH3. Jednakże mechanizm według którego EGFR jest aktywowany w wyniku dimeryzacji wymyka się próbom stworzenia prostej definicji. Skomplikowany molekularny mechanizm aktywacji jest trudny do uchwycenia z uwagi na zamrożenie konformacji sieci krystalicznej pozyskanej metodami rentgenograficznymi.

Rysunek 30. Budowa ideowa receptora EGFR (HER1). Oprócz wewnątrz błonowych motywów strukturalnych, których budowę, funkcję i działanie omówiono do tej pory, EGFR posiada część nadbłonową.



Domena kinazy EGFR może być między innymi aktywowana poprzez lokalne zwiększenie stężenia receptora w błonie (np. na skutek podwyższonej ekspresji lub obecności czynników promujących agregację) lub w wyniku następstw mutacji punktowej, takiej jak L834R zlokalizowana jest w sekwencji segmentu aktywacyjnego. Fosforylacja pętli aktywacyjnej nie jest konieczna do aktywacji kinazy, co sugeruje, że domena kinazy może ulegać samoistnej autoinhibicji. Budowa i konformacja nieaktywnego stanu wewnątrzkomórkowej domeny EGFR przypomina ten dla kinaz CDK2 oraz Src [177]. Sposób działania jest prawdopodobnie regulowany poprzez analogiczny mechanizm R-spine [178]. Autorzy pracy wykazali, że domeny kinazy EGFR samoistnie reagują na skutek dimeryzacji receptora. W konsekwencji domeny ulegają reorganizacji do aktywnego stanu podobnego jak u kinaz Src/CDK.

Mechanizm względem którego w EGFR przełączany jest aktywny i nieaktywny stan na poziomie domeny kinazy, odzwierciedla ten obserwowany w kompleksach CDK/cyklina. Jednakże EGFR oraz inni członkowie rodziny receptorów ErbB, służą jako ich własne „cykliny”. Receptory transbłonowe ErbB rozpoznawać się mogą poprzez tworzenie heterodimerów lub homodimerów. Nieaktywny stan ErbB1 (EGFR) jest reprezentowany zarówno przez pojedynczy receptor lub dimer. O przekaznictwie sygnału decyduje sposób wzajemnego ułożenia się domen wewnątrzkomórkowych. Wynika z tego, że subtelne różnice konformacyjne mogą decydować o aktywności i przekazywaniu sygnału [179]. Wpływ na

aranżację domen wewnątrzkomórkowych ma część zewnątrzkomórkowa oraz skład błony komórkowej. Mutacja EGFRvIII to najczęściej występująca mutacja wpływająca na konstrukcję części nadbłonowej. Prowadzi ona do usunięcia 267 aminokwasów z sekwencji, powodując oporność względem znanych inhibitorów. Produkt mutacji przypomina transformującą proteinę v-ErbB wirusa choroby hemolitycznej u ptaków (avian erythroblastosis virus) [180].

Kinazy pogrupować można w większe jednostki zadaniowe, będące szlakami sygnałowymi. Szlak sygnałowy PI3K/AKT/mTOR jest jednym z kluczowych mechanizmów odpowiedzialnych za cykl komórkowy. Aktywność układu PI3K-AKT regulowane są między innymi poprzez czynniki jak EGF, insulina, CaM (kalmodulina). Układ pośredniczy w promocji wzrostu i proliferacji, na niekorzyść różnicowania się dojrziałych komórek macierzystych, a szczególnie nerwowych komórek macierzystych (NSCs) [181]. Czynniki wzrostu EGF to polipeptyd złożony z 53 aminokwasów (6kDa). Ponieważ błona komórkowa stanowi barierę dla polipeptydowych substratów takich jak EGF, jednym z selektywnych terapii jest stosowanie antagonistów EGF. Znane są przeciwciała monoklonalne specyficzne względem EGFR. EGFR (Her1/ErbB1) należy do czwórki glikoproteinowych, receptorowych kinaz tyrozynowych z rodziny Her (ErbB). Pozostałe to Her2 (ErbB2/Neu), Her3 (ErbB3) oraz Her4 (ErbB4). Kinaza tyrozynowa c-Src oddziałuje specyficznie z ErbB2, lecz nie z pozostałymi członkami z rodziny EGFR [182].

Autofagia jest procesem śmierci komórkowej w którym struktury białkowe rozkładane są przez enzymy lizosomów w kompleksach autofagocytarnych. Jest to proces kataboliczny, dzięki któremu komórki eukariontów rozkładają długo żyjące organelle oraz białka. Komórki uwrażliwiają się na autofagię w przypadku konieczności wytworzenia składników odżywczych oraz energii. Ma to miejsce na przykład w przypadku stanu głodu lub niskiego stężenia czynników wzrostu czy w przypadkach wzmożonego wysiłku. Lecz także w przypadku transformacji komórek oraz jako mechanizm obronny przed wadliwie działającymi komponentami cytoplazmatycznymi. Jednym z kluczowych regulatorów procesów autofagii jest kinaza mTOR. Jej aktywność w głównym stopniu powoduje zahamowanie procesu autofagii. Sygnalizacyjne cząsteczki I klasy na szlaku ścieżki PI3K/Akt, łączą aktywność receptorowych kinaz tyrozynowych z aktywnością mTOR. W wyniku takiego przekąźnictwa, które inicjowane jest poprzez oddziaływanie receptorów z czynnikami typu insulinowego oraz innymi czynnikami wzrostu powodują, że autofagia jest trzymana w ryzach. Również białko p53 może regulować autofagię [183]. Blokowanie procesu związane jest ściśle ze ścieżkami sygnałowymi, które mogą wpływać na nowotworzenie. Kilka supresyjnych genów zaangażowanych w odgórną inhibicję sygnału mTOR (PTEN, TSC1, TSC2) może wpływać na aktywację tego rodzaju śmierci komórkowej. Przeciwnie do tego, onkogeny aktywujące mTOR takie jak klasa I PI3K oraz Akt, powstrzymują ten proces. *TP53*, jeden z najczęściej mutujących genów supresorowych w różnorakich przypadkach nowotworów u ludzi, dodatkowo reguluje autofagię w komórkach z uszkodzonym DNA.

Chromosom stanowi formę organizację materiału genetycznego wewnątrz komórki i wykazuje większy stopień upakowania informacji niż składowa nić DNA, a każdy z

chromosomów zawiera pulę genów. Przykładowo, chromosom 9, kodujący kinazę ABL1, zawiera 1299 genów. Aberracje chromosomowe to mutacje polegające na zmianie ich struktury lub liczby. Zdarzenia takie mogą nastąpić spontanicznie, lub pod wpływem czynników mutagennych. Translokacja to przeniesienie odcinków między niehomologicznymi chromosomami. Jedną z najczęstszych przyczyn powstawania i progresji białaczek (95% CML, 30% ALL, 1% AML) jest aberracja chromosomowa polegająca na translokacji t(9;22)(q34;q11), w wyniku czego powstaje gen fuzyjny BCR-*Abl*. Fragment BCR (breaking cluster region) zostaje połączony z genem *Abl* znajdującym się na chromosomie 9 w rejonie q34. Gen *Abl* jest protoonkogenem kodującym białko cytoplazmatyczne z rodziny kinaz tyrozynowych, które jest odpowiedzialne za różnicowanie, podział, adhezję i odpowiedź na uszkodzenia komórek. W warunkach normalnych ekspresja tego genu, a zatem produkcja białka podlega ścisłej regulacji. Po połączeniu z fragmentem BCR powstały gen staje się onkogenem, kodującym konstytucyjnie aktywne białko BCR-ABL. Wzmoczona aktywność tego białka upośledza zdolność komórek do apoptozy oraz ich adhezję do podścieliska. Łączny efekt obserwuje się w konsekwencji jako przełom blastyczny. Fuzyjny chromosom nazwano chromosomem Filadelfia (Ph chromosom, odkryty i opisany w 1960 roku przez Petera Nowella z Uniwersytetu Pensylwania, oraz Davida Hungerforda z Institute for Cancer Research w Filadelfii). Pierwszym celowanym lekiem, inhibitorem białkowej kinazy tyrozynowej, selektywnie rozpoznającym białko BCR-ABL1 jest imatynib wprowadzony do leczenia w 2001 roku [19]. Jego stosowanie wiąże się jednakże ze zwiększonym prawdopodobieństwem wystąpienia mutacji punktowej BCR-ABL u części pacjentów prowadzącej do lekooporności [184].

Aktywność BCR-ABL1 prowadzi do ciągłego odnawiania się macierzystych komórek białaczki. Wykazano jednocześnie, że kinaza ABL1 wykazuje funkcje supresorowe w przypadku przewlekłej białaczki szpikowej (CML), poprzez ograniczenie rozprzestrzeniania macierzystych komórek białaczki (LSCs), hamowanie ich klonogenności, promowanie różnicowania i apoptozę komórek szpikowych. Utrata genu ABL1 powodowała rozwój bardzo złośliwej, przypominającej fazę blastyczną (ostrą, zaawansowaną postać) białaczki u myszy z wszczepionymi komórkami szpiku kostnego BCR-ABL1 *Abl1*^{-/-}, przeciwnie do przewlekłej fazy CML, która wystąpiła jako wynik transformacji komórek ABL1 *Abl1*^{+/+}. Istotne z punktu widzenia projektowania inhibitorów jest to, że kinaza ABL1 wykazuje funkcje supresorowe w obecności onkogennej kinazy BCR-ABL1, a więc białka te pod względem przekazywania sygnału działają przeciwstawnie [185]. Delecja *Abl1* skutkowała tym, że komórki syntezujące BCR-ABL1 wykazywały mniejszą czułość względem inhibitorów kinaz tyrozynowych takich jak imatynib [186][187][188]. Pacjenci otrzymujący imatynib, u których nie zidentyfikowano mutacji kinazy BCR-ABL1, są bardziej narażeni na fazę blastyczną choroby, ponieważ nawet częściowa inhibicja kinazy ABL1, przy nieskuteczności imatynibu względem BCR-ABL1^{T315I} (T315I, mutacja wskutek której treonina-315 w białku BCR-ABL1 zastąpiona jest izoleucyną) prowadzić może do niestabilności chromosomalnej.

Rola BCR-ABL1 związana jest z przekazywaniem sygnału pomiędzy EGFR a PI3K/AKT/mTOR. Poprzez interakcje z układem sygnałowym PI3K/AKT/FOXO4 oraz poprzez zwiększenie ekspresji kinazy mTOR jest jedną z możliwych przyczyn blokowania istotnych

procesów komórkowych takich jak autofagia. BCR-ABL może także aktywować PI3K poprzez więcej niż jedną ścieżkę sygnałową. Aktywowana PI3K aktywuje kinazę AKT, która jest kluczowym bioefektorem w dalszych ścieżkach sygnałowych. Poprzez fosforylację białkowych substratów znajdujących się na jej szlaku, reguluje funkcjonowanie maszynery zarządzającej apoptozą (kaspaza-9, Bad, Mdm2, Ask1). Skutkuje to zwiększoną przeżywalnością oraz proliferacją komórek [189]. Tak rozległy zasięg działania BCR-ABL1, skutkujący utratą kontroli nad proliferacją i ekspansją klonów komórek białaczki, stwarza konieczność korygowania jego nadaktywności. Regulację można przeprowadzić poprzez bezpośrednie oddziaływanie inhibitora z BCR-ABL1, ale także w wyniku odcięcia sygnału na poziomie EGFR wraz z blokadą sygnału na niższych podpoziomach szlaku PI3K-AKT-mTOR. Ogólniej mówiąc, należy rozważyć kontrolę całej jednostki sygnałowej na którą ma wpływ onkogenna kinaza.

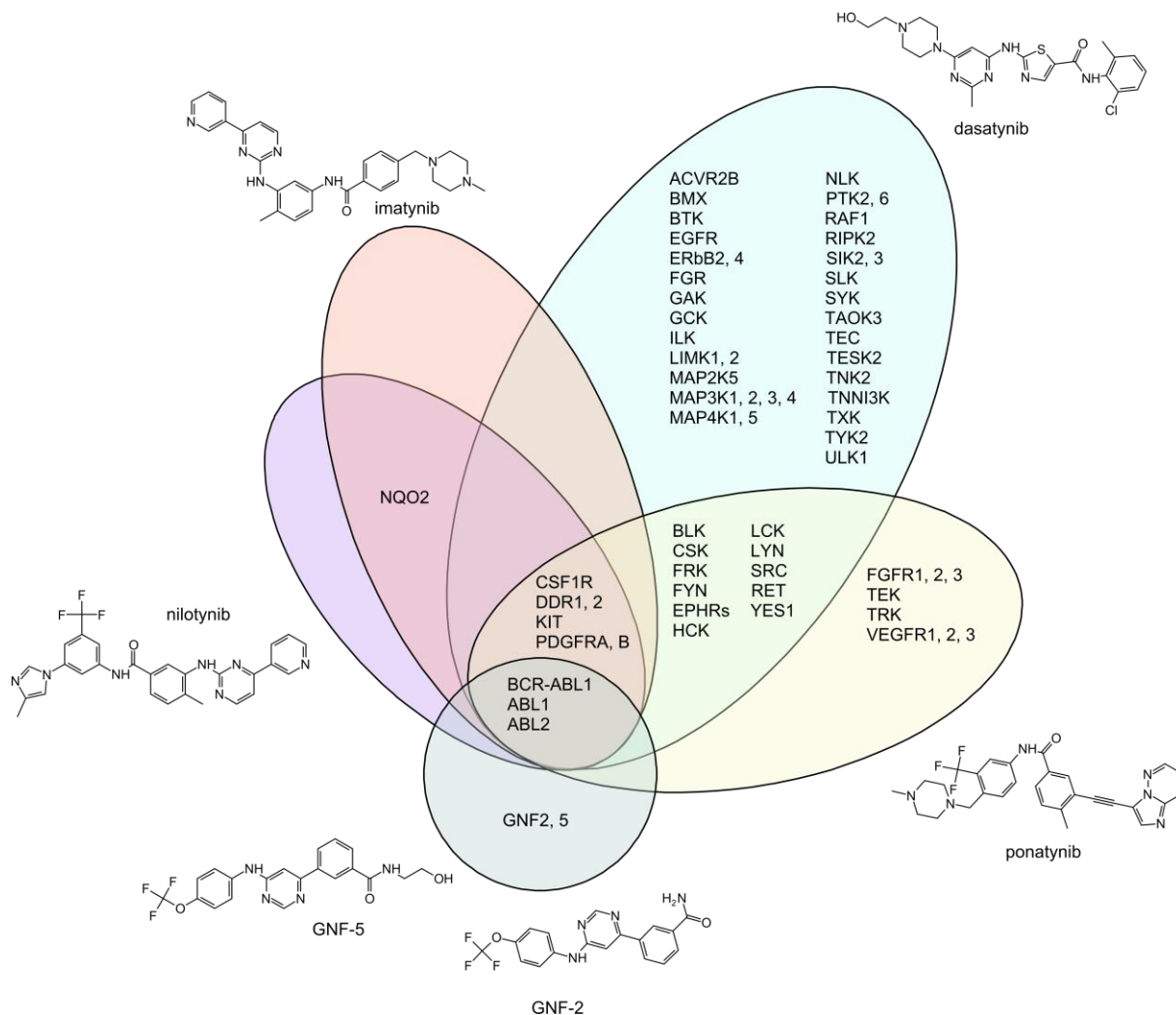
Rola kinazy ABL1 związana jest również z innymi procesami zachodzącymi w komórce. Ciekawym tego przykładem jest to, że jej katalitycznie aktywna forma bierze udział w internalizacji bakterii w trakcie zakażenia bakterią *Shigella flexneri*. Natomiast w przypadku delecji genów ABL1/ARG(ABL2) internalizacja jest blokowana [190]. Blokowanie kinazy ABL1 jest więc ideowo ciekawą koncepcją farmakologii antybakteryjnej. Szczególnie jeśli jednocześnie taki inhibitor oddziaływałby z układem kinaz w komórce bakterii.

Wielocelowa terapia onkologiczna

U początku ery chemoterapii wykorzystywano cytotoksyczne leki, działające ogólnoustrojowo, które wywierały silniejszy efekt antyproliferacyjny względem wrażliwych komórek o zwiększonej proliferacji. Zazwyczaj, dzięki różnicowaniu strukturalnemu, enzymy stanowią wygodny, precyzyjny cel molekularny. Jednakże kinazy białkowe są obszerną rodziną enzymów, wykazujących konserwatywną budowę, szczególnie obszaru w obrębie kasety wiążącej ich naturalny substrat ATP. W leczeniu różnorodnych postaciach białaczek stosuje się między innymi imatynib, nilotynib, ponatynib, dasatynib. Na **schemacie 6** wyszczególniono z jakimi kinazami wiążą się te leki. Zauważyć można imatynib oraz nilotynib są związkami bardziej selektywnymi niż dasatynib i ponatynib, które są inhibitorami o bardzo szerokim profilu aktywności. Podkreśla to, że aktualnie obrany kierunek w przemyśle farmaceutycznym, podąża w stronę leków wielocelowych. Liczba celów molekularnych z którymi oddziałuje przykładowo dasatynib może wręcz budzić kontrowersje. Jednakże pomimo tak szerokiego spektrum działania, pozostaje nieskuteczny względem lekoopornej linii raka płuc A549 (badania własne). Relatywnie niewiele prac pojawiło się na polu allosterycznych inhibitorów BCR-ABL1, wiążących się zauważalnie odległe w stosunku do kasety wiążącej ATP. Przykładowo w ostatnim czasie odkryto nowe rodzaje inhibitorów celowanych w kieszeń mirystynianu (anionu kwasu 1-tetradekanowego) które wykazały w przedklinicznych badaniach, że pokonują oporność spowodowaną mutacjami aminokwasów tworzących kasetę wiążącą ATP [191]. Inhibitory GNF-2/GNF-5 przesuwają preferencje układu domen SH2 i SH3 do pozostania w zatrzęsniętej konformacji, oznaczającą autoinhibicję białka. GNF-5 to allosteryczny inhibitor stosowany razem z inhibitorami kompetycyjnymi. Jest to bioizoster mirystynianu zlokalizowanego w N/C-terminalnym płacie kinazy [192][193][194].

SAR dla pochodnych GNF-5 przedstawiono w pracy [195]. Strukturę krystalograficzną kompleksu imatynib-ABL-GNF-2 odnaleźć można w pracy [191]. Zaskakująca jest specyficzność względem kinaz ABL.

Schemat 6. Wielocelowe FDA-approved inhibitory kinaz tyrozynowych. Schemat na podstawie [115].



Podsumowując, kinazy tworzą misterną sieć przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego a funkcjonowanie poszczególnego enzymu zależne jest od ich relacji, często mających charakter sprzężenia zwrotnego z pozostałymi czynnikami. Rozległa ich sieć powoduje, że optymalny sposób regulacji aktywności onkogennych białek, jeśli taki istnieje, zależny będzie od rodzaju zmiany nowotworowej. W celu stworzenia skutecznej terapii, efektywnej długofalowo, należy zrozumieć mechanizmy interakcji w takim systemie przekazywania. Szczególnie, że los komórki związany jest także z procesami nie zależącymi jedynie od aktywności kinaz. Komórka posiada mechanizmy naprawcze jak białko Hsp90, jak również takie zapobiegające destabilizacji genetycznej w postaci białka p53. Autofagiczne procesy pozwalają na wymianę wadliwie działającej maszyny. Obecnie zauważa się, że oprócz potrzeby nakierowania powinowactwa inhibitora na dobrze poznany onkogenny cel molekularny, od rodzaju listy na której znajdują się inne białka, z którymi wiąże się cząsteczka leku, zależy jego przeznaczenie w leczeniu specyficznej postaci nowotworu. Niewątpliwie

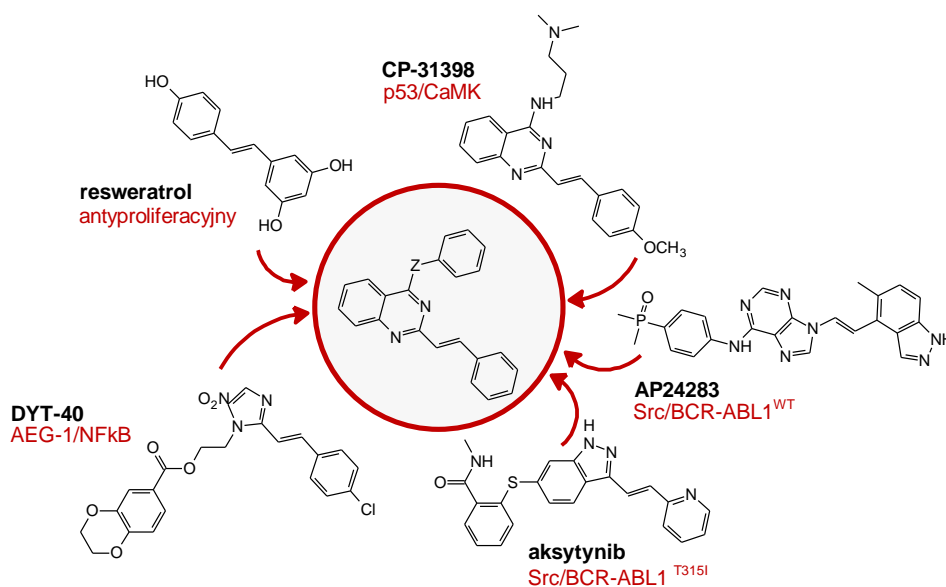
wiąże się to z zaobserwowanymi lepszymi wynikami uzyskanymi dopiero na etapie badań klinicznych, co pokazuje również, że nie łatwo przenieść wyniki badań prowadzonych na poziomie biologii molekularnej do fazy klinicznej oraz to że odkrycia są te dokonywane często przypadkiem, a dany inhibitor wykazuje adekwatny i zbalansowany profil aktywności względem szerokiego spektrum białkowych celów molekularnych predysponujący go do leczenia wybranej postaci choroby.

Badania własne

Charakterystyka otrzymanych układów styrylochinazoliny

We wcześniejszych rozdziałach zaprezentowano i omówiono związki biologicznie aktywne, które można postrzegać jako bliższe lub bardziej odległe analogi zaproponowanych kandydatów. 2,4-dipodstawione chinazoliny mogą tworzyć trzypłaszczyznowy układ strukturalny tak jak aksytynib czy AP24283, które są wielocelowymi inhibitorami o szczególnie silnej inhibicji kinaz ABL1 oraz Src. Reaktywator białka p53, CP-31398 również wykazuje spektrum aktywności wobec szerokiego wachlarza przynajmniej 337 przebadanych kinaz serynowo-treoninowych [8]. DYT-40 jest inhibitorem onkogenu AEG-1, którego stężenie rośnie nadmiernie we wszystkich rodzajach nowotworów. DYT-40 hamuje wzrost glejaka wielopostaciowego poprzez modulację ścieżek sygnalizacyjnych związanych z metadheryną (AEG-1) oraz NF- κ B. Znana jest debata w zakresie antyproliferacyjnych właściwości naturalnych resweratrolu oraz ich syntetycznych analogów, która związana może być z dezaktywacją czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [196].

Schemat 7. Koncepcja łączenia szkieletów w wyniku zlewania fragmentów strukturalnych o podobnej budowie do ligandów o znanej aktywności przeciw-enzymatycznej oraz antyproliferacyjnej.



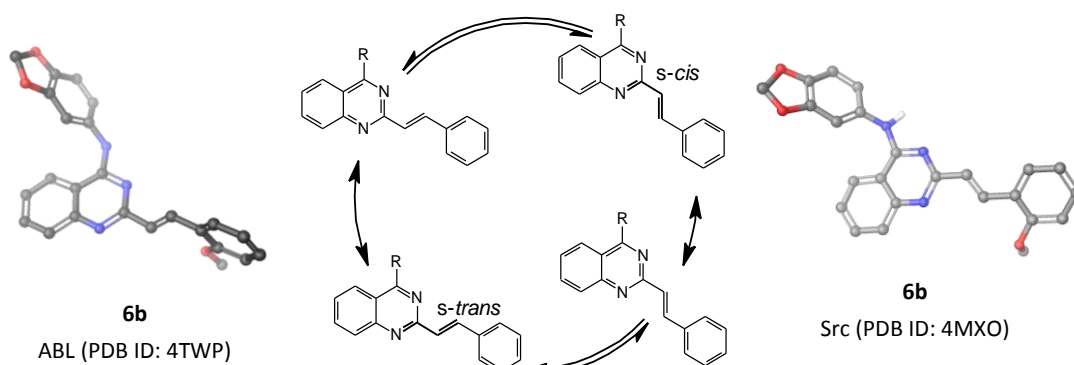
Przedstawione powyżej informacje stanowią swego rodzaju racjonalizację wyboru struktury. Autor rozprawy postrzega stosowanie rdzenia 2-styrylochinazoliny jako

odpowiedni szkielet do syntezy serii biologicznie aktywnych ligandów, o wspólnym mianowniku właściwości antyproliferacyjnych, których relatywnie optymalna heterogenność przestrzeni chemicznej pozwoli na przetestowanie hipotezy o większej efektywności leków wielocelowych, które poprzez możliwość kompleksowej regulacji mechanizmów molekularnych komórki, nie spowodują wzrostu tolerancji. Enzymy syntetyzowane są przez różnorodne organizmy, poprzez wykorzystanie podobnych fragmentów kodu genetycznego. Natura znana jest z używania podobnych fragmentów białkowych jako gotowych motywów do konstruowania zbliżonej funkcjonalności. Zaczerpnięcie fragmentów strukturalnych ze związków wykazujących różnorodne właściwości biologiczne jest jednym ze sposobów na zwiększenie szansy trafienia aktywnego związku względem różnorodnych celów molekularnych. Budowanie związku z wykorzystaniem rdzenia uprzywilejowanego może pozwolić na zachowanie przynajmniej szczątkowej aktywności związków z których te fragmenty pochodzą. W pracy tej przeszczepiane fragmenty osadzone zostały w ramach szkieletu 2-styrylochinazoliny. Analiza póź zadokowanych do enzymu kandydatów wskazuje na możliwość zróżnicowanego sposobu i orientacji dopasowania, o czym decyduje natura grup otaczających rdzeń styrylochinazoliny. Biorąc pod uwagę znane i opisane we wcześniejszych rozdziałach metody projektowania leków wielocelowych takie jak łączenie szkieletów, użycie uprzywilejowanych rdzeni heterocyklicznych, to związki zostały zaprojektowane metodą hybrydową, bez jednoznacznego wskazania na którąś z nich. Celem jest osiągnięcie efektu terapii kombinowanej, która przynosi lepsze efekty z uwagi na odcięcie onkogenego sygnału na kilku poziomach a nieoczekiwaną wartością dodaną jest synergistyczny efekt działania.

Sprężenie układu styrylochinazoliny

Układy oparte na rdzeniu styrylochinazoliny są sprzężone elektronowo, co umożliwia w pewnym zakresie, kształtowanie właściwości elektronowych ligandu poprzez rezonans. Z tego względu wymiana poszczególnych atomów lub ich grup stanowiących część szkieletu sprzężonego, wpływać może na energie konformacyjne lub energie wolnych par elektronowych, decydujących o powinowactwie do specyficznej powierzchni białek. Biorąc pod uwagę, że heterocykliczne układy takie jak chinazolina postrzegać można także jako zasady azotowe, to ich właściwości elektronowe przekładają się również na rodzaj równowag kwasowo-zasadowych, za pomocą których można również racjonalizować proces wiązania się z receptorem [197].

Rysunek 32. Układ konformerów *s-cis* oraz *s-trans* 2-(*E*)-styrylochinazoliny.



Zdaniem autora, proponowane związki mogą dynamicznie zmieniać swoje właściwości elektronowe w obrębie całej cząsteczki w trakcie indukowanego dopasowania do receptora. Ponieważ cechą charakterystyczną zaprojektowanych układów jest to, że tworzą one wielopłaszczyznową strukturę wykazującą tendencję do sprzężenia elektronowego (**rysunek 32**), to wiązanie się z receptorem regulować może zakres wychylenia wzajemnie sprzężonych fragmentów. W konsekwencji prowadzić to może do osłabienia lub utraty koniugacji. Rodzaj grup związanych z rdzeniem, powinien wpływać również na preferencyjne konformacje cząsteczki.

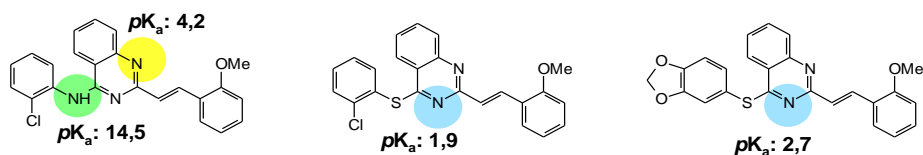
Właściwości zasadowe atomów azotu rdzenia chinazoliny mogą być kształtowane poprzez wprowadzanie podstawników o pożądanym efekcie elektronowym. Korzystną energetycznie właściwość w obszarze struktury odpowiadającej za wiązanie się z receptorem, uzyskać można więc poprzez manipulacje podstawnikami na przeciwnym końcu molekuly. Jest to szczególnie interesujące, jeśli właściwości elektronowe samego rdzenia chinazoliny mogą wpływać na sposób wiązania się ligandu. Podstawniki kształtujące właściwości elektronowe rdzenia powinny różnicować reaktywność chemiczną tych układów. Przykładowo, wyraźnie mniejsza jest wydajność reakcji kondensacji 2-metylo-4(3*H*)chinazolon z aldehydem 2-metoksybenzoesowym w porównaniu do analogicznej reakcji z 7-chloro-2-metylo-4(3*H*)chinazolonu (**tabela 9**).

Tabela 9. Wpływ podstawienia w pierścieniu chinazoliny na reaktywność w reakcji z 2-metoksybenzaldehydem.

substrat	Warunki reakcji	Wydajność, %
2-metylo-4(3 <i>H</i>)chinazolon	120 °C, MW: 80 W, 60 min, AcOH	42
7-chloro-2-metylo-4(3 <i>H</i>)chinazolon		82

Na **rysunku 33** przedstawiono wybrane struktury zaprojektowanych inhibitorów z przypisanymi wartościami pK_a do ich atomów azotu. Wartości pK_a zostały obliczone za pomocą programu komputerowego Maestro. Zauważyć można jak zmiana grupy NH przy C-4 chinazoliny, na atom siarki wpływa kształtuje zasadowość atomów azotu w szkielecie chinazoliny.

Rysunek 33. Wpływ natury elektronicznej fragmentów strukturalnych połączony z pierścieniem chinazoliny na zasadowość jej atomów azotu (pK_a). Obliczone w programie Maestro (DFT).

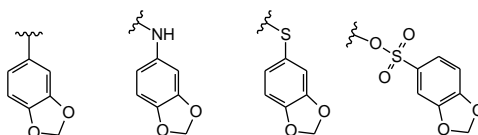


Analizując struktury znanych inhibitorów, zauważyć można, że są to różnorodne klaster atomów azotu rozproszone pomiędzy szkieletem węglowodorowym. Taki stan rzeczy może być prozaicznie związany z kwestiami własności intelektualnej lub charakterystyką badań przesiewowych, ale i z potrzebą precyzyjnej alokacji wewnątrzcząsteczkowych właściwości odzwierciedlających specyfikę docelowej proteiny. Za zmianą aranżacji heteroatomów, podążać mogą ich właściwości kwasowo-zasadowe. W wyniku czego także i sposób interakcji ligandu z białkiem na przykład poprzez sieć tworzących się wiązań wodorowych. Zagadnienie to może być istotne w świetle potrzeby kształtowania selektywności względem specyficznego białka na tle konserwatywnej rodziny enzymów. Wymiana heterocyklicznego rdzenia (core hopping) jest jednym z często stosowanych zabiegów w procesie odkrywania leków. W wyniku wymiany wprowadzony inny szkielet heterocykliczny charakteryzować się będzie inną aranżacją atomów azotu (i/lub innych heteroatomów). W rezultacie zmienić się może jednocześnie położenie akceptora wiązania wodorowego oraz jego siła, ale w konsekwencji tego także selektywność (profil aktywności).

Ugrupowanie 1,3-benzodioksolu

W rozdziale poświęconemu saracatynibowi, omówione zostały kwestie związane z farmakokinetyką ugrupowania 1,3-benzodioksolu a następnie sformułowano hipotezę, że wprowadzanie tego ugrupowania do układu 2-styrylochinazoliny może odpowiadać za zwiększenie efektu antyproliferacyjnego jaki te cząsteczki wykazują. Do syntezy chemicznej zostały wytypowane różnorodne fragmenty strukturalne zawierające motyw 1,3-benzodioksolu, które stanowić będą ich poszczególne fragmenty B oraz C.

Rysunek 34. Stosowane fragmenty strukturalne z motywem 1,3-benzodioksolu w różnorodny sposób połączono z rdzeniem chinazoliny.



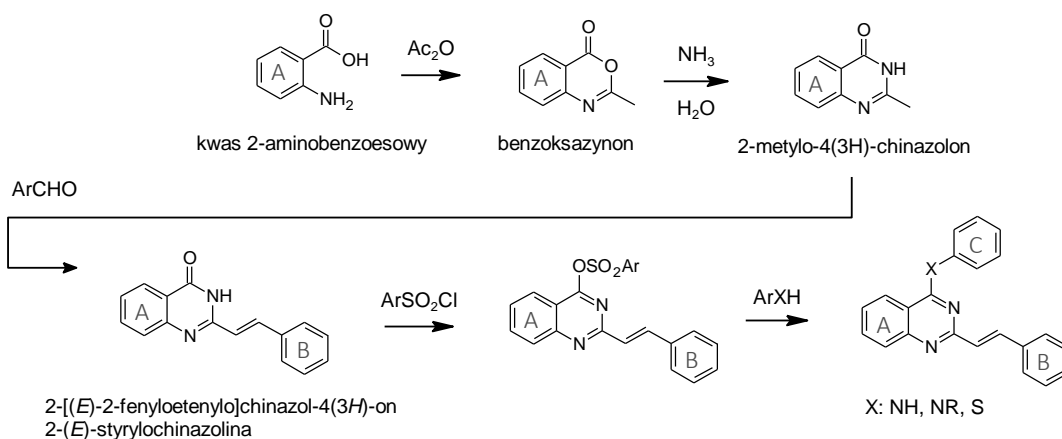
Fragmenty różnią się strukturą elektroniczną, oraz rodzajem atomu, który łączyć będzie benzodioksol z chinazoliną. Wybrano także szereg pochodnych nie zawierających ugrupowania benzodioksolu, w celu porównania właściwości antyproliferacyjnych kandydatów. Połączenia charakteryzują się różną długością wiązania. Inny zestaw atomów skutkować może zmienionym powinowactwem do białek. Zarówno poprzez tworzenie

dodatkowych oddziaływań jak również w wyniku zmienionej konformacji ligandu. Z badań krystalograficznych wynika, że pierścienie aromatyczne w układzie 2-styrylochinazolinonu leżą w jednej płaszczyźnie, jeśli nie działają na nie czynniki zewnętrzne. Jednakże w interakcji z białkiem, podobnie jak w kompleksach z metalami, cząsteczka tworzyć może układ wielopłaszczyznowy, co jest następstwem obecności wiązań rotacyjnych [198]. Jak wspomniano na wstępie pracy (**rysunek 3**), niewielka zmiana natury podstawnika może istotnie wpływać na wzajemne położenie tych płaszczyzn. Innymi słowy, poszczególne fragmenty mogą wzajemnie stabilizować wybrane konformacje w wyniku obecności korzystnych oddziaływań stereo-elektronowych.

Synteza

Proponowane układy oparte na rdzeniu 2-(*E*)-styrylochinazolinu otrzymać można z kwasu 2-aminobenzoesowego oraz jego pochodnych na drodze przedstawionych na poniższym **schemacie 8** ciągu przemian chemicznych.

Schemat 8. Schemat ścieżki syntezy proponowanych układów 2-styrylochinazolinu [199].



2-metylo-4(3*H*)chinazolon i jego pochodne

Stosując pochodne kwasu 2-aminobenzoesowego, otrzymać można w dogodny sposób różnorodne pochodne 2-metylo-4(3*H*)chinazolonu. Ich otrzymywanie wiąże się z przeprowadzeniem dwóch reakcji. W pierwszym etapie ogrzewa się substrat w nadmiarze bezwodnika octowego, do całkowitego rozтворzenia prekursora. Otrzymany w ten sposób surowy benzoksazynon, po ochłodzeniu należy przesączyć i przemyć etanolem. Bez dalszego oczyszczania benzoksazynon pozostawia się do mieszania w nadmiarze roztworu amoniaku na 7 dni. Otrzymany w ten sposób surowy chinazolon odsącza się i krystalizuje z etanolu (99 % v/v), otrzymując go w czystej postaci (ponad 99,5 %, na podstawie widma ¹H NMR). Stosując tą procedurę otrzymano dwie pochodne, 2-metylo-4(3*H*)-chinazolon oraz 7-chloro-2-metylo-4(3*H*)chinazolon.

2-(E)-styrylochinazolony

Reakcja kondensacji 2-metylo-4(3*H*)chinazolonu, lub jego pochodnej, z aldehydem aromatycznym, w wyniku której otrzymuje się rdzeń 2-(*E*)-styrylochinazolonu, jest kompatybilna z szeregiem podstawników o różnorodnych efektach elektronowych. Ich rodzaj wpływa na rozpuszczalność produktu oraz uzyskiwaną wydajność, na którą wpływa również skład medium reakcyjnego. W celu określenia tego wpływu, przeprowadzono reakcję kondensacji 2-metylo-4(3*H*)chinazolonu z aldehydem benzoesowym, stosując bezwodnik octowy, czysty kwas octowy, oraz jego wodne roztwory (**tabela 10**). Zauważono, że najwięcej zanieczyszczeń powstaje w wyniku stosowania bezwodnika octowego, natomiast reakcja prowadzona w kwasie octowym prowadziła do czystszych produktów z większymi wydajnościami. Reakcja przebiega przez produkt pośredni (alkohol), a jego formowanie może być etapem limitującym [200]. Odnosząc się do podobnych układów reakcyjnych, do efektywnej kondensacji 2-metylopirydyny z aldehydami aromatycznymi, wystarczy zastosować jeden ekwiwalent Ac_2O [201][200]. Co więcej, autorzy wskazują, że stosowanie nadmiaru AcOH może powodować obniżenie wydajności a nawet rozkład produktu. Ponieważ obecność wody niekorzystnie wpływa na równowagę tej reakcji, nie zaskakuje niska wydajność syntezy w mieszaninie $\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ (2:8) w porównaniu do reakcji bez udziału wody. Produkt otrzymać można również w wyniku użycia dwukrotnego nadmiaru aldehydu w stosunku do chinazolonu (reakcja w polu mikrofalowym) [203]. Po ochłodzeniu mieszaniny, przemywano ją gorącym Et_2O i rekrytalizowano z kwasu octowego. Jednakże, jak można zauważyć, to w trakcie ogrzewania z AcOH mogła zachodzić dehydratacja prowadząca do 2-styrylochinazolonów [202].

Tabela 10. Wpływ składu medium reakcyjnego na wydajność reakcji otrzymywania 2-styrylochinazoliny.

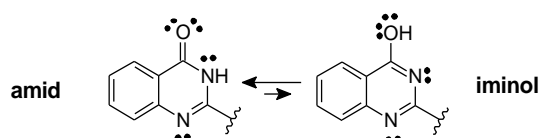
medium	Wydajność, % (warunki reakcji)
$\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ (8:2)	25 (24 h, temperatura wrzenia roztworu)
$\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ (2:8)	5 (24 h, temperatura wrzenia roztworu)
Ac_2O	42 (24 h, 130 °C)
brak	50 (MW, 15 min, 250 W), [203]
AcOH	60 (16 h, 120 °C), [204]

W ramach niniejszej rozprawy 2-styrylochinazolony otrzymywano w różnorodny sposób. Początkowo stosowano jako medium reakcyjne mieszaninę $\text{Ac}_2\text{O}/\text{AcOH}$ w zmiennych proporcjach. Procedurę jednakże zmieniono z uwagi na obserwowane mocno kolorowe zanieczyszczenia, których stężenie rosło w miarę postępu reakcji. Za najdogodniejszy układ reakcyjny uznano AcOH , o stężeniu 2-metylo-4(3*H*)chinazolonu na poziomie 0,2 M. Reakcje prowadziło przez 16 h w temperaturze łaźni olejowej 125 °C. Otrzymywane 2-styrylochinazolony z różnorodnymi podstawnikami krystalizowały z roztworu. Oczyszczano je następnie poprzez rekrytalizację z etanolu. W wariacie reakcji prowadzonych w polu mikrofalowym, zauważalnie skraca się czas do osiągnięcia podobnego poziomu wydajności jak tej uzyskiwanej konwencjonalnie. Przykładowo kondensacja 7-chloro-2-metylo-4(3*H*)chinazolonu z 2-metoksybenzaldehydem, prowadzi do styrylochinazolonu z wydajnością 82 %. Metoda ta jest dogodna przy otrzymywaniu niewielkich ilości produktu z uwagi na ograniczoną objętość naczynia reakcyjnego stosowanego w reaktorze mikrofalowym.

Funkcjonalizacja fragmentem benzenosulfonowym

Układ chinazonu wykazuje tautomerię amidowo-iminolową (**schemat 9**), a położenie punktu równowagi będzie uwarunkowane rodzajem podstawników w pierścieniu. Układy takie są więc w różnym stopniu podatne na funkcjonalizację chlorkami sulfonowymi, w wyniku czego powstają estry benzenosulfonowe. Przykłady zastosowania takiej metody funkcjonalizacji chinazonu w literaturze są nieliczne. Znacznie popularniejszym w literaturze sposobem funkcjonalizacji układów tego typu jest użycie POCl_3 . Jednakże wymagane jest długie ogrzewanie a rozdział mieszaniny jest bardziej kłopotliwy ze względu na konieczność stosowania nadmiaru odczynnika. Co więcej, kwaśne środowisko takiej reakcji może być niekompatybilne z układem wiązań nienasyconych. Warto przytoczyć przykład metody syntezy one-pot, w której nie wydziela się otrzymanego estru, dodając w kolejnym kroku do mieszaniny reakcyjnej tiofenole [205]. W ramach niniejszej pracy stosowano początkowo przepis preparatywny odnoszący się bezpośrednio do funkcjonalizacji 2-metylo-4(3*H*)chinazonu chlorkiem 4-metylobenzenosulfonowym (TsCl) w obecności Et_3N i DMAP [199]. Dodatkowo, opracowano dogodną metodę rozdziału chromatograficznego.

Schemat 9. Równowaga amidowo – iminolowa układu 4(3*H*)chinazonu.



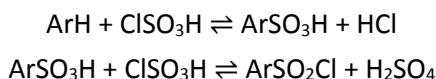
Po przeprowadzeniu szeregu syntez tym sposobem zauważono, że w miarę wydłużania czasu reakcji, który byłby potrzebny do uzyskania zadowalających wydajności, narasta stężenie produktów ubocznych. Zastosowanie *N,N*-diizopropylaminy zamiast trietyloaminy korzystnie wpłynęło na wydajność i czystość otrzymywanych pochodnych. Reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej, a krystaliczne produkty łatwo można wydzielić za pomocą metod chromatograficznych z wydajnościami rzędu 50-90 %. Dodatkowo, postępująca homogenizacja mieszaniny jest wizualną wskazówką dotyczącą konsumpcji substratów.

Pochodne sulfonowe wyróżniały się bardzo dobrą rozpuszczalnością w CH_2Cl_2 , w porównaniu do ich prekursorów - 2-styrylochinazonów. Produkty i substraty wyraźnie różniły się również czasami retencji. Dlatego wszystkie pochodne, w ilościach do kilku milimoli, wydzielono stosując krótkie kartridże do chromatografii flash (80 - 120 g silica-gel). Nieprzereagowany chlorek kwasowy kolekcjonowano jako pierwszą frakcję. Drugą frakcję stanowił produkt. W każdym przypadku efektywny rozdział uzyskać można stosując chlorek metylenu, jednakże zużywa się stosunkowo dużą ilość rozpuszczalnika, którą zredukować można stosując przepływ gradientowy $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (0 \rightarrow 50 %). Ponieważ otrzymane pochodne sulfonowe wykazywały niewielką rozpuszczalność w 2-propanolu, to pozostałości substratów usunąć można poprzez przemywanie osadu na lejku.

Chlorki benzenosulfonowe i aryliotiole

Chlorki sulfonowe posłużyły nie tylko do przygotowania estrów, lecz stanowiły także substrat do otrzymania aryliotiole w reakcji redukcji za pomocą trifenylofosfiny. Chlorki kwasów sulfonowych, można otrzymać w reakcji substratu z nadmiarem kwasu chlorosulfonowego, pod warunkiem że substraty nie są wrażliwe na działanie mocnych kwasów.

Schemat 10. Równania reakcji sulfonowania i chlorosulfonowania.



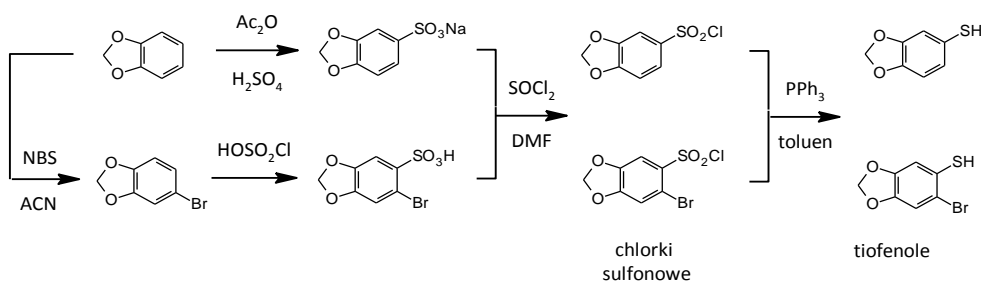
W przypadku pierścienia acetalowego 1,3-benzodioksolu należy przeprowadzić reakcje dwuetapowo. W pierwszej kolejności stosując niewielki nadmiar kwasu chlorosulfonowego, otrzymując kwas arylosulfonowy. W drugiej reakcji przekształcenie w chlorek kwasowy za pomocą chlorku tionylu. Satysfakcjonujące wydajności uzyskiwano po dodaniu DMF w ilościach nie mniejszych niż 1:40 v/v oraz stosując dziesięciokrotny nadmiar chlorku tionylu (**schemat 11**).

Schemat 11. Równanie reakcji konwersji grupy sulfonowej do chlorosulfonowej.



Alternatywnie, produkt otrzymać można stosując mieszaninę kwasu siarkowego z bezwodnikiem octowym w octanie etylu. Hipotetyczny mechanizm tej reakcji przebiega z tworzeniem *in situ* mieszanym bezwodnikiem a bezwodnik octowy może również służyć jako łapacz wody, wydzielającej się w trakcie reakcji. Reakcję kończy się dodając octanu sodu lub potasu w etanolu. Produkt uzyskuje się w postaci soli, którą stosuje się w kolejnej reakcji otrzymywania chlorku kwasowego [206]. Podsumowując, tiofenole z motywem 1,3-benzodioksolu otrzymano postępując tak jak to przedstawiono na **schemacie 12**.

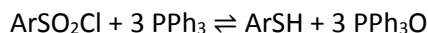
Schemat 12. Otrzymywanie chlorków kwasów sulfonowych oraz tiofenoli z motywem 1,3-benzodioksolu [207].



Redukcja chlorków kwasowych do korespondujących tiofenoli, z wykorzystaniem trifenylofosfiny jest dogodna pod względem jej przeprowadzenia i wydzielenia produktu i jest kompatybilna z większością grup funkcyjnych [208]. Szczególnie porównując tą metodę do redukcji na przykład za pomocą układu $\text{Zn}/\text{H}_2\text{SO}_4$. Reakcję prowadzono w toluenie w atmosferze argonu. W reakcji tej wolna para elektronowa na atomie fosforu atakuje

elektrofilowy atom siarki, i przebiega stopniowo przez stadia, w których stopień utlenienia atomu siarki ulega zmniejszeniu a produktem ubocznym jest tlenek trifenylfosforyny.

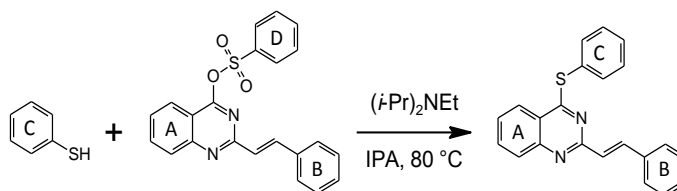
Schemat 13. Równanie reakcji redukcji atomu siarki grupy chlorosulfonowej.



4-N oraz 4-S podstawione pochodne 2-styrylochinazoliny

Estry benzenosulfonowe poddawano reakcji z aminami oraz tiolami. W literaturze opisano procedurę otrzymywania 4-aminochinazolin w mieszaninie rozpuszczalników 2-propanol/ CH_2Cl_2 (10:1), prowadząc reakcję w temperaturze pokojowej przez 24 – 72 h [199]. Zauważono, że prekursor benzenosulfonowy wykazuje bardzo słabą rozpuszczalność w 2-propanolu, natomiast w CH_2Cl_2 (a także w acetonie) rozpuszczają się bardzo dobrze. Stosując taki układ reakcyjny otrzymano szereg pochodnych chinazoliny [209]. W toku dalszych badań stosowano jako medium reakcyjne jedynie 2-propanol, ogrzewając mieszaninę reakcyjną do 80 °C. Dodawano także zasady (*i*-Pr) $_2\text{NEt}$ (**schemat 14**). Dzięki czemu uzyskiwano produkt w krótszym czasie i z większymi wydajnościami.

Schemat 14. Schemat reakcji syntezy 4-sulfanylochinazolin.



Stosując analogiczną procedurę otrzymano analogi 4-S-podstawione. W literaturze można odnaleźć przykłady opisanych reakcji otrzymywania 4-alkilo(arylo)tiochinazoliny w acetonie i 2-propanolu z użyciem nieorganicznej zasady – węglanu potasu [210][211]. Zaprezentowano także metodę bezpośredniej syntezy pochodnych tego typu, w której nie wydziela się pośredniego estru benzenosulfonowego [205]. Można również przygotować pochodną chinazoliny sfunkcjonalizowaną grupą sulfhydrylową przy atomie C-4, która wykazuje reaktywność względem elektrofili. Można więc stosować w takim wypadku halogenopochodne i pseudohalogenki [212][213].

Badania biologiczne *in vitro*

Określenie aktywności związku lub innymi słowy efektywności powinowactwa względem enzymu można określić wyznaczając wartość IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) lub wartość K_i będącą parametrem zdefiniowanym w oparciu o kinetykę procesu wiązania się inhibitora z enzymem, a więc odzwierciedla siłę powinowactwa liganda do białka. Stężenie potrzebne do uzyskania połowy maksymalnego efektu inhibicji (IC_{50}) jest to ilościowa miara potencjału substancji do hamowania specyficznej funkcji biochemicznej lub biologicznej. Powszechnie jest stosowana jako miara antagonizmu substancji w warunkach *in vitro*.

Odpowiednikiem tego wskaźnika w warunkach *in vivo* jest EC₅₀, który określa stężenie leku w osoczu dla uzyskania 50 % maksymalnego efektu (lub w uproszczeniu ED₅₀ jako dawka wywołująca odpowiedź u połowy populacji). IC₅₀ nie jest bezpośrednim wskaźnikiem powinowactwa chociaż oba te parametry można skorelować w przypadku agonistów i antagonistów kompetycyjnych, stosując równanie Cheng-Prusoff'a [214].

Równanie 2. [S] – stężenie inhibitora, K_m – stężenie inhibitora przy którym aktywność enzymu jest połową maksymalnej.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$$

Z równania wynika, że wartość IC₅₀ jest zawsze wyższa od wartości K_i. Stała dysocjacji K_i definiowana jest kinetycznie jako stosunek stałych szybkości reakcji asocjacji i dysocjacji, jednocześnie nie zależąc od stężenia enzymu. Inna często wykorzystywana metoda określania IC₅₀ polega na regresji równania logistycznego o czterech parametrach, które odzwierciedla charakterystykę wielu zjawisk biologicznych.

Równanie 3. Logistyczne równanie, odzwierciedlające charakterystykę zjawisk naturalnych

$$y = d + \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b}$$

Parametr **c** określa punkt przegięcia krzywej, parametr **b** określa nachylenie krzywej, a więc punkt gdzie krzywa o przebiegu sigmoidalnym pomiędzy asymptotami określającymi minimum oraz maksimum. Dopasowanie krzywej następuje numerycznie, na przykład metodą najmniejszych kwadratów. Wartość IC₅₀ uzyskuje się na podstawie przebiegu dopasowanej krzywej, a punkt centralny na krzywej (wartość współczynnika **c**) po operacji dopasowania stanowi wyznaczoną w ten sposób wartość IC₅₀. Metodę tę można uważać za uproszczenie równania Hilla [215], będącego równaniem różniczkowym, które opisuje jaka część makromolekuły wysycona ligandem jako funkcję stężenia ligandu. Cztero-współczynnikowy model równania logistycznego Hilla służy do modelowania teoretycznej zależności pomiędzy stężeniem inhibitora a odpowiedzi biologicznej i stosować go można do obliczenia wartości IC₅₀. Zależność ta stanowi podstawę strategii badań przesiewowych, które polegają na określaniu procentowej inhibicji przy ujednoliconej wartości stężenia [216]. Następnym krokiem jest walidacja krzywej opisującej reakcję na dawkę (concentration – response curve). Określenie IC₅₀, będącej miarą efektywności opiera się na dopasowaniu krzywej logistycznej, o której wspomniano wcześniej, chociaż stosuje się także inne bardziej złożone modele. Do walidacji wybiera się związki dla których określono siłę inhibicji dla 3 – 6 stężeń lub te które przekroczyły ustaloną wartość inhibicji dla pojedynczego stężenia. Jednakże w praktyce nie zawsze obserwuje się dobrą korelację. Podkreślić należy, że metoda oparta na dopasowaniu

krzywej logistycznej służy do przewidywania wartości IC_{50} , którą zmierzyć można wyłącznie jako zaobserwowany efekt biologiczny. Dopasowanie krzywej na podstawie danych dla 6 różnych, odpowiednio dobranych stężeń, pozwala na użyteczną predykcję. Porównywanie wartości IC_{50} pozwala porównywać efektywność leków przy stosowaniu standaryzowanych oznaczeń.

W niniejszej rozprawie² zdecydowano się określić jedynie poziom zahamowania enzymów przy stałym stężeniu badanych związków. Wyniki nie służyły bowiem jako podstawa do dalszej optymalizacji struktury wiodącej a wstępnej ich klasyfikacji do puli związków aktywnych, znacząco aktywnych i nie wykazujących aktywności. Dla najbardziej obiecujących związków przeprowadzono rozszerzone pomiary pozwalające na wyznaczenie parametru IC_{50} . Wyniki omówiono odnosząc się do oznaczonej aktywności dla dasatynibu – inhibitora o szerokim spektrum działania oraz imatynibu, czyli inhibitora selektywnego względem kinazy BCR-ABL1^{WT}.

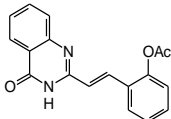
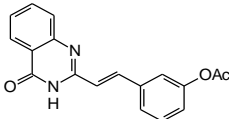
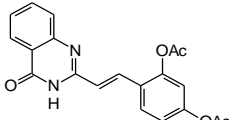
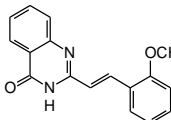
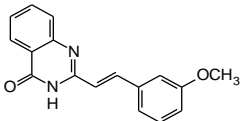
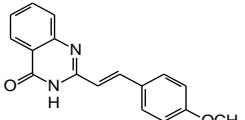
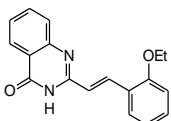
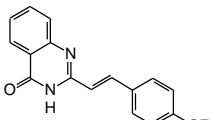
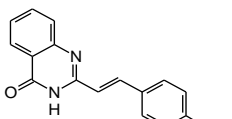
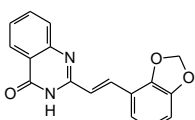
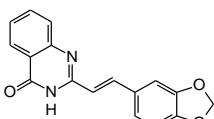
Tabela 11. Oznaczenie parametru IC_{50} dla kilku wybranych kandydatów i porównanie do aktywności dasatynibu.

inhibitor	IC_{50} (nM)							
	ABL1	BRK	BTK	CSK	Fyn A	Lck	Lyn B	Src
4	478 ± 260	933 ± 480	456 ± 95.0	704 ± 203	NT	1,360 ± 447	1,255 ± 904	626 ± 425
6b	182 ± 56.0	NT	237 ± 53.0	706 ± 69.1	191 ± 25.0	515 ± 110	442 ± 82.0	209 ± 49.0
9b	NT	956 ± 303	287 ± 144	402 ± 135	NT	1,183 ± 154	2,118 ± 1,112	897 ± 368
10b	NT	626 ± 61.0	880 ± 397	473 ± 262	NT	1,497 ± 569	644 ± 277	804 ± 382
Dasatinib	3.1 ± 0.5	5.3 ± 0.5	3.0 ± 0.7	1.3 ± 0.3	1.6 ± 0.8	2.3 ± 0.7	1.2 ± 0.1	0.9 ± 0.1

Jako cele molekularne w przeprowadzonych badaniach wybrano grupę ośmiu kinaz tyrozynowych w której szczególnie wyróżnić można ABL1 oraz kinazy przynależące do rodziny Src. Dobór podyktowany był znaczeniem jakie mają mutacje tych kinaz w nowotworzeniu i jednocześnie w regulowaniu mechanizmu apoptozy [217]. Kinazy wykazują zróżnicowaną ekspresję w zależności od linii komórek.

² Badania aktywności biologicznej zostały wykonane we współpracy z dr Katarzyną Malarz z Instytutu Fizyki Uniwersytetu Śląskiego, częściowo w ramach projektu preludeum "Spojrzenie na aktywność biologiczną i mechanizm działania nowych pochodnych styrylochinazoliny, jako inhibitorów kinaz tyrozynowych" NCN 2016/23/N/NZ7/00351.

Tabela 12. Wyniki testów na inhibicję panelu kinaz.

inhibitor		Efekt hamujący kinazy tyrozynowe, %							
Nr.	Structure	ABL 1	BRK	BTK	CSK	Fyn A	Lck	Lyn B	Src
1		0	30	51	14	0	0	0	40
2		15	36	0	0	0	0	6	1
3		30	0	0	64	19	0	25	51
4		41	44	52	44	0	32	19	40
5		0	0	7	5	0	0	0	0
6		18	28	69	36	2	60	78	51
7		13	51	0	16	0	0	13	0
8		8	0	0	0	0	0	0	0
9		27	60	0	0	0	0	24	0
10		0	31	0	0	40	0	0	0
11		23	44	0	0	4	0	0	0

12		9	51	0	0	61	4	32	0
13		0	0	0	37	0	0	0	0
14		0	43	45	37	0	0	0	0
15		0	18	54	34	29	11	52	58
16		47	0	24	17	0	21	9	0
17		13	0	19	0	0	0	0	5
18		20	0	0	38	2	21	46	37
1a		0	35	27	28	4	20	0	0
2a		0	25	31	0	34	43	0	3
3a		0	20	9	20	0	11	0	0
4a		0	0	0	0	0	0	0	0
5a		28	15	19	0	24	26	0	0

6a		0	9	40	34	0	10	38	26
1b		32	0	43	35	24	35	49	21
2b		20	12	76	64	63	0	29	57
3b		0	15	0	0	0	0	0	0
4b		0	19	0	14	0	0	0	0
5b		0	0	0	0	0	0	0	0
6b		95	0	87	39	90	54	61	84
7b		0	38	18	35	1	43	0	14
8b		0	75	0	31	0	0	0	0
9b		0	24	74	63	0	29	20	41
10b		0	46	38	61	0	29	56	55
11b		0	51	0	6	0	0	0	0
12b		0	0	0	0	0	0	0	1

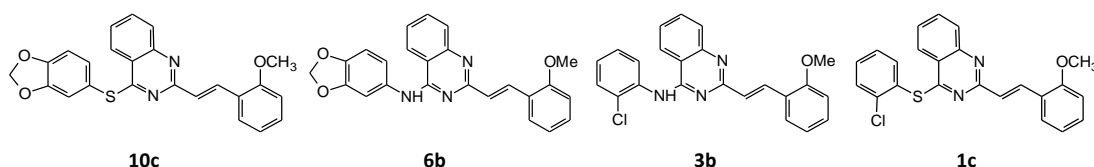
13b		0	0	0	0	0	0	0
14b		0	0	5	34	8	0	0
15b		0	0	10	32	0	0	14
16b		0	4	0	37	0	0	0
1c		94	51	91	51	90	79	67
2c		35	0	13	15	50	48	0
3c		29	0	46	17	34	0	3
4c		0	0	15	0	0	0	0
5c		41	15	19	0	0	0	5
6c		41	27	39	33	57	51	32
7c		45	0	53	39	25	0	0
8c		0	0	0	0	0	0	0

9c		35	19	28	39	52	60	57	54
10c		0	25	15	0	21	28	0	0
11c		4	0	31	35	59	13	26	0
12c		4	15	30	51	18	41	56	74
13c		18	0	2	50	19	0	1	40
14c		11	0	9	7	19	0	0	21
CP-31398		10	35	37	1	31	28	47	16
Imatinib		77	0	0	0	0	0	0	0
Axitinib		100	0	0	11	44	10	37	11
AZM 475271		8	0	0	0	76	15	100	100

Zauważa się, że przebadane pochodne można przypisać do trzech ogólnych grup. Związki nieaktywne lub wykazujące nieznaczną aktywność wobec niektórych kinaz, oznaczone kolorem zielonym. Do grupy tej przynależą między innymi związki **5**, **8**, **3b**, **4b**, **5b**, **13b**. Druga grupa to związki selektywne o aktywności głównie w zakresie pomiędzy 40 – 60 % i aktywne wobec mniej niż trzech kinaz. Reprezentantami tej grupy to między innymi związki **1**, **3**, **7**, **9**, **12**, **8b**, **13c**. Związki te można traktować jako struktury wiodące. Szczególnie te niepodstawione przy C-4 atomie chinazoliny. Ostatnia grupa to związki, które wykazują się

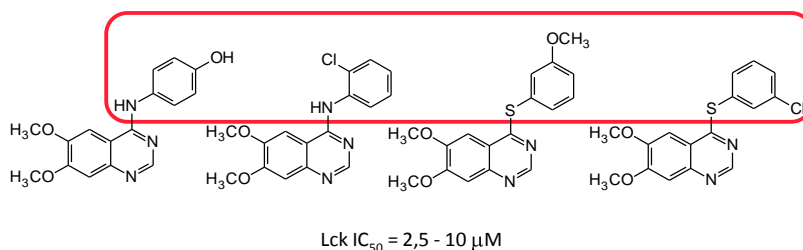
niską selektywnością i jednocześnie wykazują aktywność przekraczającą 60% w badanym stężeniu przynajmniej dla jednej z kinaz. W grupie tej znajdują się **6**, **2b**, **6b**, **1c**, **6c**. Można zauważyć, że więcej jest w tej grupie związków o bardziej rozbudowanej strukturze, chociaż można się spodziewać, że mniejsze fragmenty wykażą niższą selektywność. Układy te w większości są rozwinięciem struktury związku **4**, stanowiącego fragment 2-[(*E*)-2-(2-metoksyfenylo)etenilo]chinazolin-4(3H)-onu. Na wyróżnienie zasługują dwie pary związków, których struktury zaprezentowano na **rysunku 35**. Związek **6b** jest inhibitorem o szerokim spektrum. Przykładowo IC₅₀ dla ABL1 wynosi 182 nM. Związek **10c** wykazuje słabą lub szczątkową aktywność względem testowanych kinaz. Względem ABL1 jest nieaktywny. Związek **3b** można uznać za nieaktywny, w przeciwieństwie do **1c**, który jest inhibitorem o szerokim spektrum, przewyższającym aktywność związku **6b**.

Rysunek 35. Zestawienie dwóch par struktur, różniących się pomiędzy sobą grupą NH oraz S.



Ponieważ w literaturze odnaleźć można przykłady struktur o analogicznym sposobie podstawienia chinazoliny, to porównać można wpływ podstawnika 2-styrylowego na aktywność otrzymanych kandydatów. Na poniższym rysunku przedstawiono opatentowane cząsteczki, będące aktywne względem kinazy Lck [218]. Czerwoną linią zaznaczono wspólne fragmenty strukturalne. W bezpośrednim porównaniu do związków na **rysunku 36**, struktury **3b**, **4b**, **11b**, **7c**, **8c** nie wykazują aktywności hamującej Lck, natomiast mniej podobne cząsteczki **3b**, **4b**, **11b**, **7c**, **8c** są aktywniejsze. Jednakże należy mieć na względzie, że mechanizm wiązania z miejscem aktywnym może być w tych przykładach odmienny.

Rysunek 36. Struktury znanych inhibitorów wykazujących inhibicję kinazy Lck.



Omówienie zależności struktura - aktywność

Otrzymane związki mogą wykazywać wielocelowe działanie w obrębie szerszego zbioru kinaz niż tego testowanego w ramach tej pracy. Co więcej, niewykluczone że z uwagi na obecność w ich strukturach uprzywilejowanych fragmentów strukturalnych, związki te mogą oddziaływać także z innymi celami molekularnymi niż kinazy. Z tego powodu postanowiono omówić rozłącznie jaki wywołują efekt cytotoksyczny względem komórek oraz efekt inhibicji

enzymatycznej. Dokowanie *in silico* wiąże się nierozdzielnie z problemem zamrożonej struktury, będącej obrazem wykrystalizowanego kompleksu. Wiązanie się cząsteczki związku chemicznego jest dynamicznym procesem, w którym gość i gospodarz ulegają przekształceniom konformacyjnym. W celu określenia w jakim stopniu wpływa to na obraz dokowania, porównano pozycje ligandów zadokowanych do tego samego białka ABL (PDB ID: 4WA9 - aksytynib, PDB ID: 3KF4 - związki oparte na szkielecie puryny, **rysunek 2**) ale wykrystalizowanego z innym ligandem. Oba związki wykazują zbliżoną budowę względem serii otrzymanych pochodnych z uwagi na sposób połączenia fragmentu heterocyklicznego rdzenia z podstawnikiem. Stosując inną strukturę krystalograficzną kinazy ABL1, uzyskano odmiennie zadokowane ligandy. Posługiwanie się obrazami z dokowania *in silico* należy traktować z ostrożnością, a otrzymana poza jest jedną z możliwych konformacji układu w miejscu aktywnym enzymu i nawet jeśli kompleks tego typu się tworzy w rzeczywistości, to jego stała trwałości może być na tyle niekorzystna, że ligand może oddysocjować i ponownie wiązać się z białkiem lecz w innej konfiguracji konformacyjnej.

Jak każdy inny spontaniczny proces, także niekowalencyjne wiązanie się liganda następuje tylko wtedy jeśli związane jest to z ujemną energią swobodną wiązania ΔG , będącą w matematycznym ujęciu wynikiem dodawania członu entalpowego ΔH oraz entropowego ($-T\Delta S$). Szczególnie trudna jest do przewidzenia wartość zmiany entropii, która związana jest z reorganizacją cząsteczek wody znajdującej się w miejscu aktywnym enzymu, na skutek wiązania się ligandu. Tam, gdzie dostępna jest krystalograficzna struktura kompleksów białkowych, kuszące staje się spekulowanie nad przełożeniem termodynamiki wiązania na geometrię tych układów. Jednakże jak dotychczas, brak jest miarodajnego modelu pozwalającego badać te zależności w zautomatyzowany sposób [219]. Wartości entropii oraz entalpii wrażliwe są na warunki takie jak stężenie jonów oraz skład buforu [220]. Szczególnie, że etapy protonowania i deprotonowania związane z dynamiką wiązania mogą przebiegać odmiennie nawet pośród kongenerycznego zbioru ligandów, co również może być związane z przesunięciem wartości pK_a z uwagi na odmiennie lokalne środowisko w miejscu aktywnym enzymu, związane z indukowanym dopasowaniem dielektrycznym [221].

Według autora, analiza wpływu rodzaju podstawników wokół pierścienia chinazoliny na aktywność biologiczną związków pokazuje, że wywołana inhibicja może być złożeniem efektu stereoelektronowego całej molekuly, a będącej wynikiem sprzężenia elektronowego. Niewielka modyfikacja struktury znacząco wpływała na aktywność pochodnej. Nie można jednakże wykluczyć, że jest to specyfika zagadnienia związanego z kinazami. W **tabeli 13** zilustrowano na przykładach jak wpływ atomu chloru w pozycji C-7 chinazoliny moduluje aktywność inhibitorów.

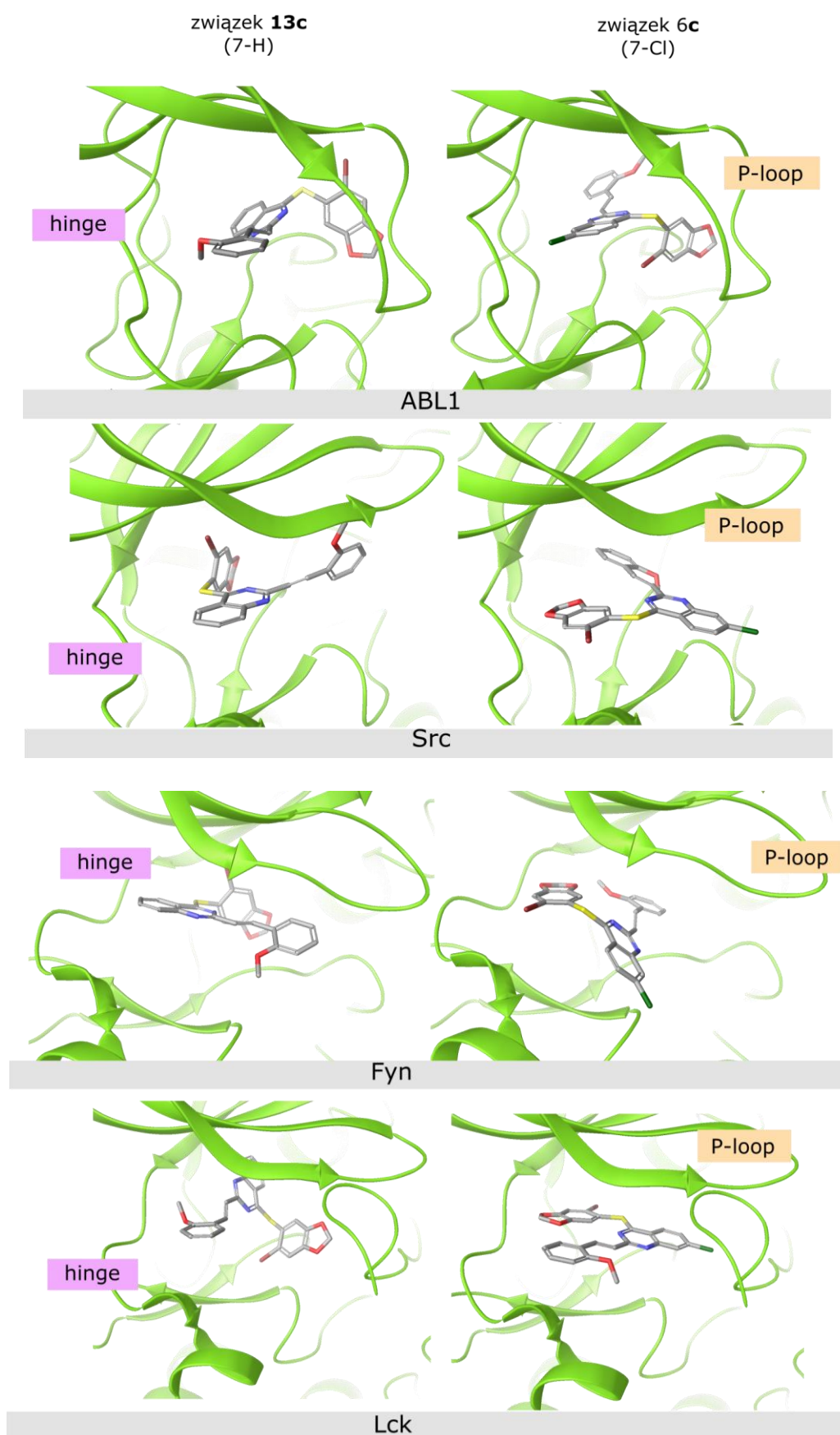
Tabela 13. Porównanie wpływu podstawnika 7-Cl chinazoliny na aktywność inhibitora.

Nr.	Struktura	% inhibicji							
		ABL 1	BRK	BTK	CSK	Fyn A	Lck	Lyn B	Src
4		41	44	52	44	0	32	19	40
16		47	0	24	17	0	21	9	0
17		13	0	19	0	0	0	0	5
1c		94	51	91	51	90	79	67	79
2c		35	0	13	15	50	48	0	0
4c		0	0	15	0	0	0	0	0
6c		41	27	39	33	57	51	32	53
7c		45	0	53	39	25	0	0	8
10c		0	25	15	0	21	28	0	0
13c		18	0	3	50	19	0	1	40
14c		11	0	9	7	19	0	0	21

Projektowanie oparte na fragmentach rodzi wiele kontrowersji, związanych między innymi z niejednoznaczną korelacją pomiędzy naturą oddziaływania z białkiem fragmentów oraz cząsteczek zbudowanych na ich szkieletach. Praca teoretyczna opublikowana w 2018 roku wskazuje na to, że sposób w jaki oddziałują fragmenty oraz ich leko-podobne superstruktury, są podobne dla tego samego białka. Zostają więc zachowane w miarę rozbudowywania cząsteczki [222]. Problem ten podjęto w tej pracy gdzie większość związków została otrzymana w oparciu o fragment **4**. Związki **16** i **17** posłużyły do zbadania wpływu, czy podstawnik 7-Cl jest korzystny z punktu widzenia selektywności i siły efektu inhibicji. Ponieważ związek **16** wykazał się większą selektywnością w kierunku ABL1 niż związek **4**, otrzymano bardziej rozbudowane układy **4c** oraz **6c**. Związek **4c** całkowicie utracił aktywność na tle analogu **1c**, natomiast **6c** zyskał na aktywności względem całego panelu enzymów. Modyfikacja struktury **1c**, związana z wymianą atomu chloru na atom bromu obniżyła aktywność związku **13c**. Na uwagę zasługuje obecność atomów halogenu w strukturach omawianych związków. Atom halogenu może oddziaływać w różnoraki sposób z elementami białka. Może on oddziaływać z nukleofilami oraz elektrofilami. Elektrofile zbliżają się do atomu halogenu z boku wiązania C-X (względem normalnej do wiązania), natomiast nukleofile osiowo od tyłu wiązania C-X. Wykazują one anizotropię gęstości elektronowej z dodatnim obszarem (σ -hole) potencjału elektrostatycznego znajdującego się naprzeciw wiązania C-X. Trzy wolne pary elektronowe atomu halogenu tworzą pas ładunku ujemnego wokół jądra atomu. W konsekwencji nadaje to chlorowcowi zdolność do oddziaływania z ugrupowaniem karbonylowym lub innymi klasycznymi akceptorami wiązań wodorowych. Szczególnie wyróżnia się możliwość oddziaływania pomiędzy atomem tlenu o hybrydyzacji sp^2 , które wykazuje charakter liniowy C—Cl \cdots O. Siła elektrostatycznego oddziaływania wzrasta wraz z rozmiarem atomu halogenu. Z uwagi na głównie elektrostatyczny charakter oddziaływania, zależy także od elektroujemności podstawników związanych z atomem węgla C-X. Dlatego atomy halogenu we fragmencie C, będą różnić się zauważalnie właściwościami elektronowymi (4-N-SQ od 4-S-SQ).

Porównując pary związków **1c** oraz **4c** jak i **8c** oraz **9c**, zauważyć można, że wprowadzenie atomu chloru w pozycję C-7 pierścienia spowodował utratę aktywności hamującej względem całego panelu testowanych kinaz. Tym bardziej zaskakujący okazał się rezultat rozbieżnych właściwości w parze **13c** oraz **6c**. Związek z podstawnikiem 7-Cl wykazał wyższą aktywność. Na **rysunku 37** zaprezentowano zadokowane, względem tego samego układu odniesienia, pozy **6c** oraz **13c** do struktur krystalograficznych kinaz ABL1, Fyn oraz Src.

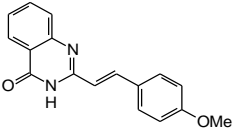
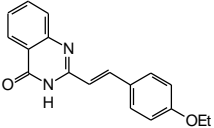
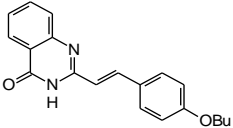
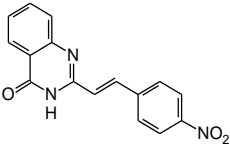
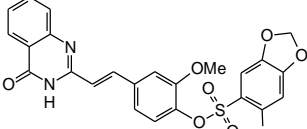
Rysunek 37. Zadokowane związki **13c** oraz **6c** do kinaz ABL1, Src, Fyn, Lck.



Można zauważyć, że ligandy przyjmują każdorazowo odmienne pozy względem tej samej kinazy. zróżnicowane pozy. Zarówno dla związku **6c** i **13c** bardzo podobne pozy zaobserwować można dla kinaz Src i Fyn. Dla żadnego z enzymów związek **13c** nie ułożył się w sposób, w którym fragment 6-bromo-2*H*-1,3-benzodioxolowy przylega do fragmentu zawiasowego kinaz. Przeciwnie, związek **6c** układa się tym fragmentem przy fragmentach zawiasowych kinazy, kierując atom 7-Cl w kierunku zwieńczenia beta zakrętu pętli P-loop. Dla tych kinaz związek ten wykazuje najwyższe aktywności. Obecność benzodioxolowej podstruktury w okolicy pętli P-loop obniżało aktywność lub związek był nieaktywny. Pozy ligandów zostały zaprezentowane bez uszczegóławiania natury oddziaływań pomiędzy gościem i gospodarzem. Interesujące jest to, że rdzeń chinazoliny pozostaje w centralnym miejscu wnęki kinazy. Można spojrzeć na to w ten sposób, że od rodzaju podstawników zależy orientacja rdzenia. Taka interpretacja wyniku mogła by być spójna z wyjaśnieniem powodu dla którego niektóre struktury są uprzywilejowane. Związek **13c** wykazuje selektywność względem kinazy Csk oraz Src. Kinaza Csk (inaczej c-Src) jest bliźniaczą strukturą kinazy Src, stąd można wnioskować że związek preferuje te białka na tle pozostałych testowanych. Obecność atomu bromu w podstrukturze 1,3-benzodioxolu korzystnie wpływa na siłę inhibicji w porównaniu do związku **10c**. Związek **14c** posiada dodatkową grupę metoksy w styrylowym fragmencie B i nie wykazuje selektywności, pozostając jednocześnie raczej nieaktywnym związkiem. Związek **7c**, z podstawnikiem 3-metoksyfenylowym wykazał większą selektywność względem kinazy BTK w porównaniu do **6c**. Różnice te można tłumaczyć jako konsekwencja zahamowanej rotacji wiązań fragmentu acetalowego. Co za tym idzie, inny jest efekt elektronodonorowy i kierunkowość wiązania a tym samym wolnych par elektronowych.

W tabeli **14** zestawiono aktywności homologicznych struktur styrylochinazonów z grupami elektronodonorowymi (podstawniki OMe, OEt, OBu), oraz silnie elektronoakceptorową grupę nitrową. Szczególnie zauważalny jest porównywalny profil aktywności związków **6** i **15**, mimo podstawników o przeciwstawnym efekcie elektronowym. Z kolei w szeregu związków posiadających podstawniki alkoksylowe (**6**, **8**, **9**), porównując inhibicję kinazy BRK, wyróżnia się związek z grupą butylową (**9**). Jest on znacznie aktywniejszy na tle analogów z grupami metoksy oraz etoksy. Wykazuje też wyższą selektywność. Uważa się, że kinaza BRK przynależy do oddzielnej rodziny (kinaz Frk) niż Src [223]. Związek **12** wykazuje najwyższą selektywność względem kinazy BRK i Fyn. Natomiast żaden ze związków nie wykazał wysokiej selektywności wyłącznie względem kinazy Fyn.

Tabela 14. Struktury i aktywności związków przedstawiono celem omówienia selektywności hamowania kinazy BRK.

inhibitor	% inhibicji							
	ABL1	BRK	BTK	CSK	FYN A	LCK	LYN B	SRC
6 	18	28	69	36	2	60	78	51
8 	8	0	0	0	0	0	0	0
9 	27	60	0	0	0	0	24	0
15 	0	18	54	34	29	11	52	58
18 	20	0	0	38	2	21	46	37

Ogólnie zauważalnym trendem jest to, że związki nie wykazujące aktywności względem ABL, hamują aktywność innych testowanych kinaz. Odnaleźć można jeden tylko związek (**5c**) selektywny względem ABL1. Zaskakujące jest to, że związki **6** oraz **15**, posiadające podstawniki o odmiennych efektach elektronowych, wykazują bardzo zbliżoną aktywność. Struktury tych związków w dokowaniu *in silico* pokazuje, że płaszczyzny pierścieni **6** i **15** się nakładają.

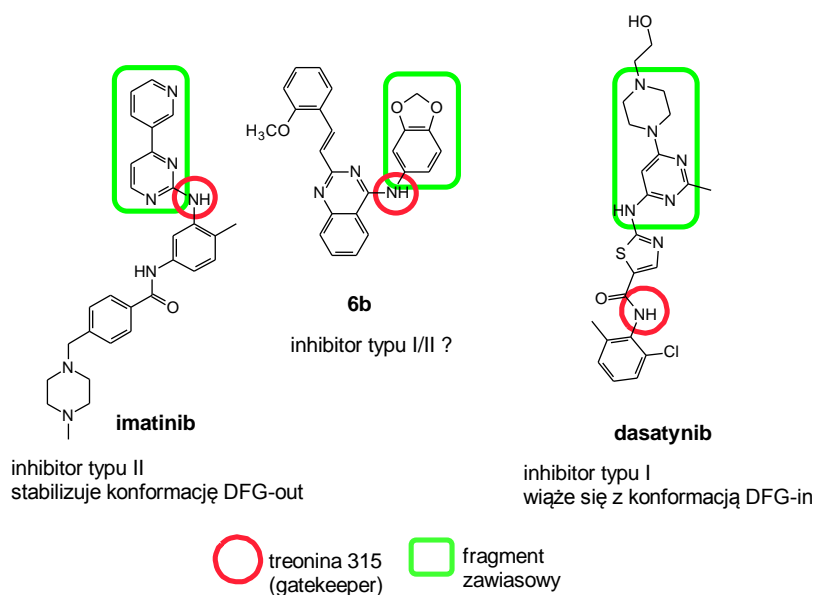
Atom siarki w tioeterach charakteryzuje się różnorodnymi właściwościami elektronowymi, których natura jest kierunkowa. Zdolny jest do oddziaływań zarówno z grupami bogatymi jak i ubogimi w elektrony. Te bogate elektronowo grupy zbliżają się do dwuwiązalnego atomu siarki wzdłuż kierunku osi wiązania pomiędzy atomami C-S (od strony orbitalu antywiążącego σ^*). Natomiast grupy ubogie w elektrony wykazują tendencję do zbliżania się w kierunku od strony wolnych par elektronowych [224][225]. Co więcej, tioeterowy atom siarki wykazuje podobną naturę oddziaływania z pierścieniami aromatycznymi jak atom chloru. W związku z powyższym otrzymane 4-S-podstawione chinazoliny (**1c-14c**) wykazywać mogą wielocelową aktywność poprzez specyficzne oddziaływania z poszczególnymi kinazami.

Porównując aktywności inhibitorów w **serii b** oraz **serii c** warto zwrócić uwagę na różnicę pomiędzy wynikami dla par **3b** i **1c** oraz **5b** i **5c**. Zauważalne jest także, choć w mniejszym stopniu, że w zbiorze związków **serii c** jest więcej aktywniejszych struktur niż w

zbiorze **serii b**. Eksperyment *in silico* ujawnił, że otrzymane ligandy lokowały się w kieszeni wiążącej ATP w zróżnicowany sposób. U części z nich dopatrzeć się można podobnego ułożenia motywów strukturalnych jak u klinicznych i eksperymentalnych inhibitorów. Analiza interakcji zadokowanych kandydatów ujawniła, że rozbudowa szkieletu 2-styrylochinazolonów (**seria 1-18**) jest korzystna dla efektywności ich wiązania się z przebadanymi kinazami.

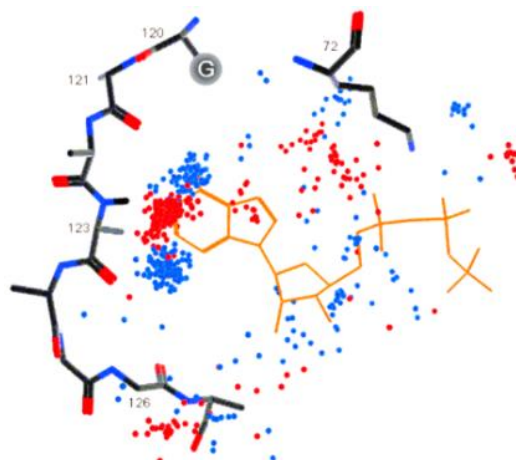
Na **rysunku 38** porównano budowę selektywnego względem ABL1 imatynibu, dasatynibu o szerokim wielocelowym działaniu oraz związku **6b**. Zaznaczono obszary oddziałujące z *gatekeeper* oraz z obszarem zawiasowym kinazy (BCR)ABL1^{WT}.

Rysunek 38. Porównanie budowy i sposobu interakcji **6b** z kinazą ABL1 względem imatynibu i dasatynibu.



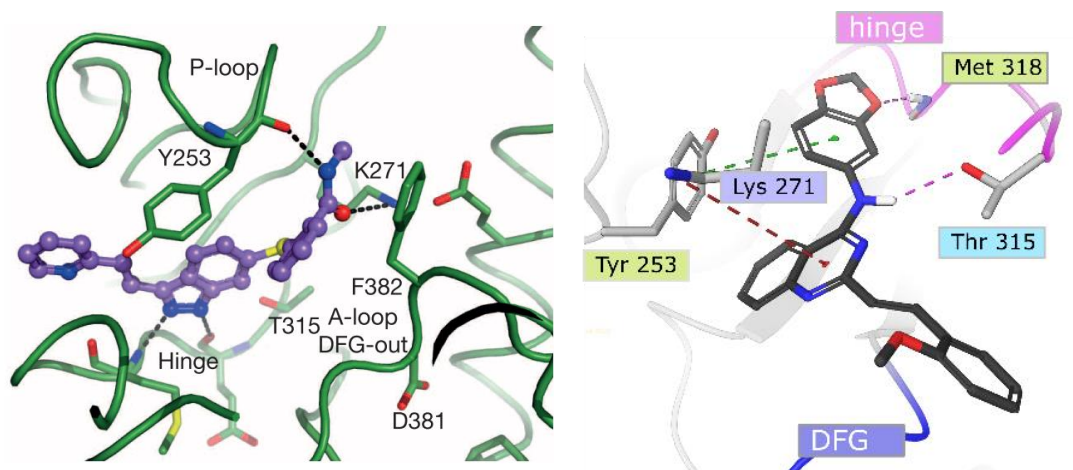
Analiza farmakofora konserwatywnego miejsca wiążącego ATP u kinaz pokazuje (**rysunek 39** [226]), że fragment adeniny znajduje się w bliskim sąsiedztwie fragmentu zawiasowego kinazy (atom N³ oraz atom N przy atomie C⁶ są donorami wiązań wodorowych dla aminokwasów w regionie zawiasowym, natomiast atom N¹ występuje w roli akceptora). Kliniczne inhibitory EGFR/Src, których struktury opierające się na szkielecie chinazoliny (erlotynib, afatynib, saracatynib), wiążą się w miejscu aktywnym kinazy podobnie jak nukleotydy. W pozycji C-2 ich pierścieni chinazoliny znajduje się atom wodoru. Obszerniejsze podstawniki uniemożliwiłyby kontakt rdzenia chinazoliny z fragmentem zawiasowym. Sugeruje to, że otrzymane styrylowe pochodne wiążą się w odmienny sposób niż znane inhibitory oparte na rdzeniu chinazoliny.

Rysunek 39. Obraz farmakoforowych cech miejsca aktywnego kasety wiążącej ATP u kinaz. Wyraźnie zaznaczają się obszary akceptorowe i donorowe dla wiązań wodorowych w pobliżu obszaru zawiasowego, zakończonego fragmentem *gatekeeper*. Kolor niebieski – donory wiązania wodorowego/kolor czerwony – akceptory. *Gatekeeper* (G) jest zwieńczeniem sekwencji zawiasowej.



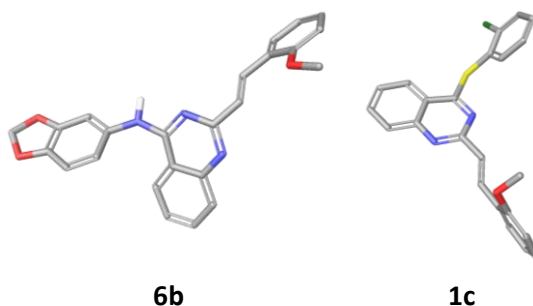
Sposób wiązania się aksytynibu z białkiem ABL1 (ko-kryształ, **rysunek 40**) pokazuje, że atomy azotu pierścienia indazolu tworzą dwa wiązania wodorowe z fragmentem zawiasowym oraz, że Lys271 oddziałuje z karbonylowym atomem tlenu ugrupowania amidowego a karbonylowy atom tlenu Tyr253 z amidowym atomem azotu aksytynibu. Ponownie, zadokowana struktura związku **6b** pokazuje odmienny sposób wiązania się cząsteczki niż znany inhibitor o zbliżonej budowie. Co więcej związek **6b** choć w odmienny sposób, również oddziałuje z Tyr253 i Lys271. Jak zasygnalizowano wcześniej, charakterystyczne jest to, że chinazolina nie bierze udziału w wiązaniu się z obszarem zawiasowym, lecz zapewnia oddziaływania z aminokwasami znajdującymi się w odmiennej lokalizacji miejsca aktywnego, w tym z konserwatywną lizyną 271. Wiązanie z regionem zawiasowym odbywa się poprzez fragment benzodioksolu, który oddziałuje z konserwatywną Tyr253 (fragment pętli bogatej w glicynę – Ploop) oraz Met318 (fragment zawiasowy). Przypuszczać można na podstawie takiego obrazu, że chinazolina pełni centralną funkcję pozycjonującą jej podstawniki w kluczowym otoczeniu miejsca aktywnego białka.

Rysunek 40. Ko-kryształ aksytynibu [227] oraz zadokowany związek **6b** do kinazy ABL1 (PDB ID 4WA9)



Jeśli fragment chinazoliny nie bierze udziału w interakcji z zawiasem enzymu, to otwiera to nowe możliwości projektowania inhibitorów z wykorzystaniem chinazoliny. **Rysunek 41** ilustruje to zagadnienie poprzez porównanie aranżacji dwóch najaktywniejszych związków **6b** i **1c** w miejscu aktywnym kinazy ABL1, względem tego samego układu odniesienia.

Rysunek 41. Pozy z dokowania ligandów **6b** oraz **1c** (PDB ID 4WA9) względem tego samego układu odniesienia miejsca aktywnego kinazy.



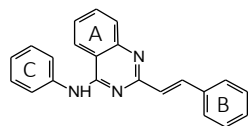
Zastąpienie grupy NH, tioeterowym fragmentem powoduje utratę możliwości oddziaływania z T315 poprzez wiązanie wodorowe. Analogi tioeterowe mogą mieć inny mechanizm wiązania się z miejscem aktywnym enzymu. Mniejsza selektywność inhibitora **1c** może sugerować, że pochodne tego typu mogą być niewrażliwe na zmianę aminokwasu *gatekeeper* w sekwencji białka, a tym samym mogą potencjalnie utrzymać aktywność względem mutantu.

Aktywność względem wybranych linii komórek nowotworowych

Aktywność przeciwnowotworową otrzymanych związków określono w warunkach *in vitro* wobec szeregu linii komórek nowotworowych. Jednocześnie ich toksyczność oznaczono wobec komórek normalnych (fibroblastów skóry NHDF). Do testów wybrano panel linii obejmujący możliwie szerokie spektrum typów nowotworów z uwzględnieniem ich znaczenia terapeutycznego oraz potencjalnej wrażliwości na inhibitory kinaz będących przedmiotem niniejszych badań. Nowotwory krwi reprezentowane są przez komórki białaczki K562. Białaczki są pierwszymi nowotworami w leczeniu których zastosowano inhibitory zwłaszcza omawianej już ABL, jakkolwiek inne kinazy np. z grupy SRC mają znaczenie w rozwoju oporności tej linii [228]. Nowotwory piersi i płuc to obok nowotworów jelit najczęściej diagnozowane odmiany. W tych badaniach są one reprezentowane odpowiednio przez linie komórek MCF-7, A549 oraz HCT116. Warto zwrócić uwagę na status białka p53 w tych liniach. Białko to odpowiedzialne jest za kontrolę spójności genomu oraz węzeł głównych szlaków kierujących komórkę na drogę śmierci lub promujących przeżywalność. Mutacje genu kodującego tę proteinę identyfikuje się w ponad połowie wszystkich nowotworów i zazwyczaj związane są z większą złośliwością oraz trudnościami w terapii [229]. Wybrana linia nowotworów jelit dostępna jest w typie dzikim oraz z delecją genu TP53 (HCT116 p53-/-) przekładającą się na brak funkcjonalnego białka. Dwie pozostałe linie wybrane do badań to komórki nowotworu trzustki (PANC-1) oraz mózgu (U251). Są to dwa najtrudniejsze obecnie

w terapii nowotwory charakteryzujące się niskim poziomem przeżywalności oraz generalnie złą prognozą. Również te dwie linie odznaczają się mutacjami punktowymi wpływającymi na funkcjonalność białka. Wyniki zostały opracowane jako parametry IC_{50} zmierzone testem MTS wykorzystującym dehydrogenazę mitochondrialną jako cel molekularny pozwalający określić żywotność komórek. Jako związki referencyjne zostały wykorzystane stosowane obecnie leki przeciwnowotworowe z grupy inhibitorów kinaz; aksytynib, dasatynib, erlotynib, imatynib. Grupę standardów rozszerzono o eksperymentalne leki AZM475271 (inhibitor Src) oraz reaktywator białka p53 CP-31398, który jest bliźniaczo podobny do badanych układów i jak opisano wcześniej może wykazywać aktywność względem kinaz. W tabelach 15-18 zebrano wyniki dla każdej kongenerycznej grupy związków. Najbardziej aktywne w danej grupie oznaczono kolorem żółtym, drugie w kolejności, kolorem zielonym. Związki o parametrze aktywności powyżej 25 μ M uznano za nieaktywne.

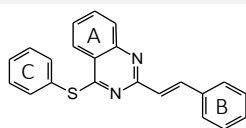
Tabela 15. Aktywność 4-N-podstawionych chinazolin wyrażona jako IC₅₀ względem linii komórek nowotworowych oraz NHDF. Na żółto zaznaczono najaktywniejszy związek dla danej linii komórek, kolorem zielonym drugie w kolejności.



	K562 (μM)	PANC-1 (μM)	HCT116 +/+ (μM)	HCT116 -/- (μM)	MCF-7 (μM)	A549 (μM)	U251 (μM)	NHDF (μM)
1b	n.b.	n.b.	>25	>25	15,57 ± 0,95	16,41 ± 0,37	>25	23,19 ± 1,81
2b	n.b.	n.b.	>25	>25	7,840 ± 1,545	>25	>25	>25
3b	n.b.	n.b.	>25	16,12 ± 2,75	18,93 ± 3,96	>25	>25	>25
4b	n.b.	n.b.	>25	17,92 ± 4,24	8,294 ± 0,512	12,99 ± 0,58	14,64 ± 6,09	13,82 ± 2,42
5b	n.b.	n.b.	21,69 ± 6,58	16,4 ± 4,01	11,16 ± 1,91	16,63 ± 3,103	>25	17,53 ± 1,61
6b	6,008 ± 0,204	3,776 ± 0,409	15,94 ± 3,18	13,69 ± 1,45	4,860 ± 0,671	9,875 ± 0,623	5,453 ± 0,362	7,716 ± 0,581
7b	n.b.	- n.b.	10,77 ± 0,39	13,27 ± 0,36	10,80 ± 0,58	11,58 ± 1,185	9,743 ± 0,220	14,38 ± 0,715
8b	n.b.	n.b.	22,9 ± 0,73	22,87 ± 0,87	14,73 ± 1,16	20,83 ± 0,72	>25	>25
9b	n.b.	n.b.	4,38 ± 0,24	5,03 ± 0,15	4,383 ± 0,544	7,410 ± 0,389	3,200 ± 0,248	4,59 ± 0,69
10b	n.b.	n.b.	10,89 ± 0,63	10,75 ± 0,51	10,14 ± 0,205	15,39 ± 3,97	>25	11,19 ± 0,46
11b	n.b.	n.b.	21,92 ± 1,30	22,72 ± 0,57	9,194 ± 0,352	14,80 ± 0,235	20,46 ± 0,285	14,21 ± 0,49
12b	n.b.	n.b.	>25	>25	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
13b	n.b.	n.b.	>25	>25	>25	>25	>25	n.b.
14b	14,5 ± 0,49	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
15b	17,7 ± 1,085	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
16b	0,994 ± 0,008	2,251 ± 0,122	1,317 ± 0,241	0,946 ± 0,11	1,331 ± 0,051	2,258 ± 0,554	1,175 ± 0,021	1,45 ± 0,06

Związki oparte na strukturze 4-N podstawionej chinazoliny charakteryzują się raczej niską aktywnością wobec badanych linii komórkowych za wyjątkiem linii nowotworu płuc w której większość badanych pochodnych uzyskała aktywność wyższą niż dasatynib. Należy zauważyć, że wynika to przede wszystkim z niskiej aktywności tego leku wobec tej linii komórek. Pochodne **3b**, **13b**, **14b** i **15b** można uznać za nieaktywne wobec badanych linii. Największą aktywność w tej grupie pochodnych wykazał **16b** o aktywności na poziomie kilku mikromoli wobec wszystkich badanych linii komórek nowotworowych. Jednocześnie będąc równie toksyczny względem normalnych komórek skóry (NHDF). Indeks terapeutyczny związku **6b** kształtuje się na równie niskim poziomie.

Tabela 16. Aktywność 4-S-podstawionych chinazolin wyrażona jako IC₅₀ względem linii komórek nowotworowych oraz NHDF. Żółtym kolorem zaznaczono najaktywniejsze związki względem poszczególnego nowotworu.

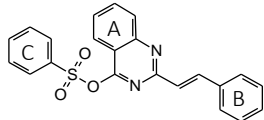


	PANC-1							NH
	K562	(μM)	HCT116	HCT116	MCF-7	A549	U251	DF
	(μM)		+/+ (μM)	-/- (μM)	(μM)	(μM)	(μM)	(μM)
1c	6,434 ± 1,197	>25	>25	>25	18,52 ± 3,87	>25	>25	>25
2c	>5	>2,5	>15	>10	n.b.	13,44 ± 0,595	20,91 ± 1,63	14,5 7 ± 1,27
3c	>15	>25	>10	>10	n.b.	>15	>15	>25
4c	>25	n.b.	>25	>25	>25	>25	>25	-
5c	1,088 ± 0,299	17,85 ± 1,315	>25	>25	8,034 ± 0,958	>25	25,03 ± 2,53	>25
6c	21,25 ± 2,19	>25	>25	>25	>25	>25	>25	n.b.
7c	>10	>15	>15	>15	n.b.	>15	>15	>20
8c	>25	n.b.	>25	>25	>25	>25	>25	-
9c	>25	>25	>20	>20	-	>15	>10	>25
10c	2,042 ± 0,454	>25	10,74 ± 0,33	9,427 ± 1,485	16,26 ± 3,22	>25	>25	>25
11c	>25	n.b.	>25	>25	>25	n.b.	n.b.	n.b.
12c	>25	>25	>25	>25	22,78 ± 0,365	>25	>25	>25
13c	>2,5	>10	>5	>5	n.b.	>5	>5	21,7 0 ± 1,53
14c	>10	>15	>15	>15	n.b.	>15	20,15 ± 0,895	21,3 1 ± 0,79 5

Wymiana atomu azotu na siarkę w analogicznych układach styrylochinazolin spowodowała znaczny wzrost aktywności wobec niektórych kinaz (**Rysunek 35**). Efekt ten nie przekłada się jednak w bezpośredni sposób na bardziej skomplikowany model komórek. Wyniki zamieszczone w **tabeli 16** wskazują na spadek aktywności. Z drugiej jednak strony niektóre związki uzyskały większą selektywność głównie dzięki mniejszej cytotoksyczności. Najbardziej wyróżniające się tutaj związki to **10c** i **5c** które wykazują wysoką aktywność wobec komórek białaczki K562. W przypadku pochodnej **10c** jest to poziom kilkukrotnie wyższy niż na innych testowanych liniach a indeks selektywności tego związku wyliczony względem komórek normalnych (NHDF) przekracza 10. Pochodna **5c** wykazuje się nawet wyższą selektywnością oraz indeksem terapeutycznym (TI>25). Nieco słabszą aktywność przy wciąż wysokiej

selektywności charakteryzują się również pochodna **1c**. Reasumując można zauważyć, że wprowadzenie atomu siarki nie przekłada się w prosty na spodziewaną aktywność pomimo interesujących parametrów oznaczonych wobec wyizolowanych enzymów (jak na przykład związek **1c**). Wyjaśnieniem tego faktu może być zmieniony metabolizm tioeterów skutkujący zmniejszeniem stężenia pochodnych w miejscu działania.

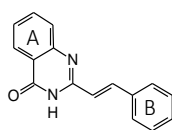
Tabela 17. Aktywność benzenosulfonianów wyrażona jako IC₅₀ względem linii komórek nowotworowych oraz NHDF.



	K562 (μM)	PANC-1 (μM)	HCT116 +/+ (μM)	HCT116 -/- (μM)	MCF-7 (μM)	A549 (μM)	U251 (μM)	NHDF (μM)
1a	0,173 ± 0,031	0,235 ± 0,042	1,567 ± 0,357	3,724 ± 0,487	9,128 ± 2,053	11,34 ± 1,76	1,907 ± 0,214	>25
2a	0,078 ± 0,027	0,097 ± 0,030	0,363 ± 0,028	0,239 ± 0,030	4,599 ± 1,022	7,652 ± 0,987	1,757 ± 0,388	9,415 ± 1,652
3a	10,19 ± 0,819	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
4a	2,699 ± 0,519	>25	>25	21,67 ± 1,185	9,791 ± 1,232	>25	>25	>25
5a	0,172 ± 0,034	3,981 ± 0,597	0,880 ± 0,086	0,563 ± 0,121	8,325 ± 1,940	>25	1,897 ± 0,649	12,54 ± 0,855
6a	0,246 ± 0,055	2,905 ± 0,622	1,2 ± 0,132	1,312 ± 0,29	16,76 ± 2,06	>25	2,303 ± 0,234	15,67 ± 1,41

Z uwagi na metodykę syntezy w trakcie części prac laboratoryjnych otrzymano szereg pochodnych benzenosulfonowych, które zostały również przekazane do badań aktywności przeciwnowotworowej. Warto nadmienić, że pochodne tego typu charakteryzują się relatywnie dużą reaktywnością wobec nukleofili. Z tego powodu mogą zachowywać się w warunkach *in vitro* jako pro-leki [230]. Wykazują wysoką lipofilowość przy jednoczesnym występowaniu trzech atomów tlenu w grupie estrowej co jest także powodem zwiększonej rozpuszczalności związków. Uzyskane wyniki są interesujące i warte omówienia. Podobnie jak w przypadku innych grup związków, pochodne benzenosulfonianowe wykazują wyższą aktywność wobec komórek białaczki (K562), które jako komórki zawiesinowe są bardziej wrażliwe na działanie ksenobiotyków. Najwyższą aktywność, na poziomie kilkudziesięciu nanomoli wykazuje **2a**. Związek ten osiąga wysokie aktywności wobec wszystkich badanych linii nowotworowych w szczególności linii nowotworów jelit oraz trzustki. Jego toksyczność wobec komórek normalnych pozwala zachować zadowalający poziom selektywności. W przypadku komórek białaczki oraz trzustki jest to poziom bardzo dobry (TI>100). Ze wszystkich badanych linii najniższą podatność na inkubację z badanymi pochodnymi benzenosulfonowymi wykazują komórki nowotworu płuc (A549). Znacznie bardziej podatne są obie linie adenokarcynomy jelita, przy czym nie obserwuje się tutaj większych różnic uzależnionych od obecności białka p53. Podsumowując warto zauważyć że związki tego typu mogą stanowić interesujący wątek przyszłych badań.

Tabela 18. Aktywność 4(3*H*)chinazolonów wyrażona jako IC₅₀ względem linii komórek nowotworowych oraz normalnych komórek fibroblastów (NHDF).



	K562 (μM)	PANC-1 (μM)	HCT116 +/+ (μM)	HCT116 -/- (μM)	MCF-7 (μM)	A549 (μM)	U251 (μM)	NHDF (μM)
1	-	-	>25	17,24 ± 0,72	>25	>25	>25	>25
2	-	-	15,33 ± 1,04	9,287 ± 1,347	6,370 ± 1,332	>25	>25	>25
3	-	-	>25	22,98 ± 1,06	>25	>25	>25	>25
4	-	0,6048 ± 0,106	2,47 ± 0,79	1,46 ± 0,55	4,447 ± 0,96	>25	1,469 ± 0,215	>25
5	-	-	>25	>25	-	-	-	-
6	-	-	>25	>25	>25	>25	>25	-
7	-	-	23,28 ± 3,625	6,429 ± 0,978	6,256 ± 1,306	21,83 ± 2,535	19,47 ± 1,095	>25
8	-	-	>25	>25	-	-	-	-
9	-	-	>25	>25	>25	>25	>25	-
10	-	-	>25	>25	-	-	-	-
11	-	-	>25	>25	-	-	-	-
12	-	-	>25	>25	12,76 ± 2,98	13,81 ± 1,08	16,29 ± 6,10	14,85 ± 2,05
13	-	-	>25	>25	>25	>25	14,93 ± 1,85	-
14	-	-	>25	>25	-	-	-	-
15	-	-	>25	>25	-	-	-	-
16	-	1,077 ± 0,158	0,358 ± 0,072	0,248 ± 0,048	0,546 ± 0,157	2,475 ± 0,533	0,562 ± 0,137	6,302 ± 0,881
17	-	4,30 ± 0,262	2,774 ± 0,521	2,111 ± 0,473	12,89 ± 2,21	21,79 ± 1,84	4,462 ± 0,498	>25

Styrylochinazolony z powyższej tabeli, zgodnie z przewidywaniami osiągnęły niski poziom aktywności wobec linii komórkowych. Najwyższą aktywność wykazuje pochodna **16**, osiągając wobec komórek HCT116 poziom kilkuset nanomoli. Związek ten jest też najbardziej cytotoksyczny wobec komórek normalnych a indeks terapeutyczny waha się w zależności od linii komórkowej.

Tabela 19. Aktywność związków odniesienia wyrażona jako IC₅₀ względem linii komórek nowotworowych oraz NHDF.

	K562 (μM)	PANC-1 (μM)	HCT116 +/+ (μM)	HCT116 -/- (μM)	MCF-7 (μM)	A549 (μM)	U251 (μM)	NHDF (μM)
imatynib	0,133 ± 0,030	>25	44,55 ± 2,41	51,21 ± 4,09	>25	>25	>25	>25
AZM475271	0,198 ± 0,022	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
CP-31398	3,087 ± 0,36	>25	18,63 ± 0,92	26,28 ± 1,41	26,96 ± 2,103	>25	18,77 ± 1,65	12,26 ± 0,54
erlotynib	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
aksytynib	0,103 ± 0,013	>25	>25	>25	>25	>25	>25	>25
dasatynib			3.58 ± 0.14		1.11 ± 0.26	23.73 ± 1.96		0.71 ± 0.06

W tym miejscu zwraca uwagę bardzo duża różnica w wartościach IC₅₀ dla zarejestrowanego w leczeniu dasatynibu a serią otrzymanych inhibitorów. Mimo, że dasatynib jest związkiem wykazującym średnio stukrotną różnicę w wartościach IC₅₀ dla badanych kinaz, to efekt obserwowany względem komórek prezentuje się inaczej. Zaznacza się to szczególnie dla linii A549 - komórek nabłonkopodobnych ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuca. Są to pęcherzykowe podstawne komórki nabłonka gruczołowego płuca, które rosną w monowarstwie. Wartość dla dasatynibu to 23,73 ± 1.96 μM, natomiast związek **16b** jest najefektywniejszym z otrzymanych a jego wartość IC₅₀ dla linii A549 wyniosła 2,258 ± 0,554 μM, co stanowi dziesięciokrotność efektywności dasatynibu. Co więcej, cytotoksyczność względem komórek NHDF pozwala określić indeks terapeutyczny i dla związku **16b** jest on dwudziestokrotnie wyższy niż dla dasatynibu (względem A549). Pozostałe standardy (imatynib, AZM475271, erlotynib i aksytynib, **tabela 19**) nie wykazały aktywności względem komórek A549. Linia MCF-7 (estrogenozależny gluczorak, ang. adenocarcinoma estrogenresponsive) raka piersi została po raz pierwszy wyprowadzona w roku 1970 z komórek metastazy (wysięku opłucnowego) nabłonkowego gruczolaka gruczołu piersiowego. Związek **16b** również wykazał wysoką cytotoksyczność (IC₅₀=1,331 ± 0,051 μM) na tle innych przebadanych związków i bardzo zbliżoną do tej uzyskanej po zastosowaniu dasatynibu. Najwięcej aktywnych związków o umiarkowanych wartościach IC₅₀ względem MCF-7 oraz A549 znajduje się w grupie 4-N-podstawionych chinazolin.

W **tabeli 20** zebrano struktury celem omówienia ich właściwości cytotoksycznych względem linii komórek K562 będącej modelem białaczki, w świetle ich zdolności do hamowania testowanych kinaz tyrozynowych.

Tabela 20. Struktury otrzymanych związków, wykazujących najwyższy efekt cytotoksyczny względem linii komórek K562.

2a		0	25	31	0	34	43	0	3
6b		95	0	87	39	90	54	61	84
16b		0	4	0	37	0	0	0	0
1c		94,2 9	51,2 7	91,0 2	51,1 3	90,4 1	79,0 8	67,0 8	79,5 2
5c		41,0 3	15,7 9	19,1 2	0	0	0	0	5,12
10c		0	25,0 3	15,9 3	0	21,4 9	28,0 8	0	0

Związki **6b** oraz **1c** to najefektywniejsze inhibitory ABL1 spośród otrzymanych struktur. Wykazały się podobną wartością IC_{50} względem K562, odpowiednio $6,008 \pm 0,204 \mu M$ oraz $6,434 \pm 1,197 \mu M$. Jednakże najsilniejszy efekt cytotoksyczny wykazały związki **5c**, **10c**, **16b**, **2a**. Pośród nich jedynie **5c** wykazał zdolność do hamowania kinazy ABL1. Najaktywniejszy **2a** ($IC_{50}=0,078 \mu M \pm 0,027 \mu M$), jest około 10x efektywniejszy od aksytynibu oraz imatynibu, chociaż to związki **6b** oraz **1c** wykazały większą inhibicję kinazy ABL1 niż bardzo selektywny imatynib. Jest także aktywniejszy niż nieselektywna doksorubicyna, której mechanizm działania opiera się o interkalację DNA (K562 $IC_{50} = 0,399 \mu M$). Estry benzenosulfonowe wykazują ogólnie wysokie aktywności względem przebadanych nowotworowych linii komórkowych lecz charakteryzują się relatywnie dużym indeksem terapeutycznym. Szczególnie związek **1a**, który jest bardzo selektywny wobec komórek nowotworowych. Relatywnie podobne aktywności w tej klasie związków sugerować by to także mogło, że ich molekularny mechanizm działania jest podobny. Podkreślić należy, że aksytynib jest słabym inhibitorem BCR-ABL1^{WT} natomiast model K562 nie wykazuje obecności mutantu T315I, na który aksytynib jest szczególnie czuły. Z tego powodu nie stosuje się go u pacjentów bez zidentyfikowanej lekoopornej względem imatynibu kinazy BCR-ABL1^{T315I}. Związek **14b**, dla którego obserwuje się szczątkową aktywność hamująca przebadane kinazy, wykazuje dwa razy mniejszą wartość IC_{50} dla K562 niż związek **6b**.

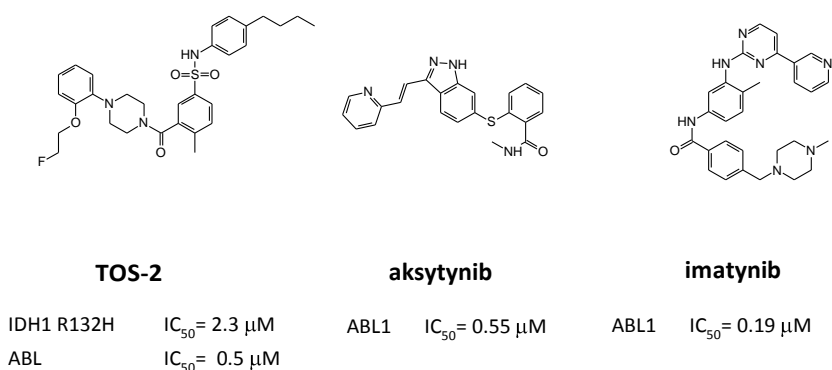
Wnioski

Jako rezultat niniejszej pracy uzyskano związki, których właściwości można podzielić z uwagi na wywołany przez nie efekt. Pierwsza kategoria obejmuje związki o dobrych właściwościach przeciwnowotworowych, charakteryzujących się niższymi wartościami IC_{50} w odniesieniu do zarejestrowanych inhibitorów kinaz tyrozynowych (dasatynib). Wykazują one jednocześnie słabszy efekt hamujący wobec testowanych kinaz. W drugiej grupie znalazły się związki zdecydowanie mniej efektywne pod względem efektu przeciwnowotworowego wobec komórek w warunkach *in vitro*, lecz z drugiej strony są najsilniejszymi wśród otrzymanych inhibitorów. Należy zaznaczyć, że inhibitory o szerokim spektrum powinowactwa do białek, wysycić mogą miejsca wiążące nieistotne z farmakoterapeutycznego punktu widzenia, i zmniejszają tym samym ich dostępność dla kinaz i innych białek, które stanowią ważniejsze cele molekularne. Taki rezultat nie jest jednak zaskakujący, ponieważ struktury zaprojektowanych związków oparte są na uprzywilejowanym fragmencie chinazoliny. Co więcej, ich dodatkowe fragmenty stanowią wspólne motywy strukturalne względem innych związków biologicznie aktywnych. Nie można więc rozstrzygnąć, czy profil aktywności jakie wykazują otrzymane związki jest rezultatem przypadkowo wywołanego efektu synergistycznego. Warto jednak zauważyć, że relatywnie wysokie aktywności przeciwnowotworowe wraz z dobrą selektywnością i niewielką toksycznością wobec komórek normalnych czynią z wybranych układów obiecujące struktury wiodące. Jednocześnie dobra aktywność wobec wyizolowanych enzymów stanowi pewien przyczynek do poznania możliwego mechanizmu działania. Ponieważ otrzymane 2,4-dipodstawione układy styrylochinazoliny mają obszerny podstawnik przy C-2 atomie, atomy azotu w pierścieniu heterocyklicznym nie mogą brać udziału w tworzeniu wiązań wodorowych z fragmentem zawiasowym kinazy, co sugeruje że otrzymane pochodne wiążą się w odmienny sposób z białkiem niż znane inhibitory kinaz tyrozynowych. Bardziej rozbudowane ligandy nie traciły aktywności a nawet można odnotować wzrost ich powinowactwa względem niektórych celów molekularnych. Sugerować to może, że miejsce aktywne kinaz mogłyby zaakomodować inhibitory z rdzeniem styrylochinazoliny o większych szkieletach niż tych otrzymanych w ramach niniejszej rozprawy. Zdaniem autora warto rozszerzyć wachlarz pochodnych z naciskiem na funkcjonalizację w pozycjach C-5 do C-8 pierścienia chinazoliny.

Dalsze plany badawcze

W trakcie badań poświęconych projektowaniu i syntezie inhibitorów kinaz tyrozynowych, zrodziły się dodatkowe pytania i cele, które wykraczają poza zakres niniejszej rozprawy. Zdaniem autora warto zgłębiać aspekt związany z lekami o poszerzonym spektrum aktywności. Przykładowo dehydrogenaza izocytrynianowa IDH1 jest ważnym enzymem metabolizującym. Mutacje genu kodującego IDH1 R132H powodują zmianę funkcji tego białka, prowadząc do generowania onkogenego metabolitu. Jego powstawanie wiąże się obecnie z białaczką oraz glejakiem wielopostaciowym. Podobieństwo strukturalne inhibitorów IDH1 R132H względem niektórych inhibitorów kinaz tyrozynowych warto wykorzystać jako punkt wyjścia do uświadczenia ich geometrii celem konstruowania leków wielocelowych. W wyniku przeprowadzonych wstępnych badań okazało się że jeden ze znanych inhibitorów IDH1 R132H hamował niektóre kinazy tyrozynowe. Poniżej przedstawiono wyniki tego eksperymentu (**rysunek S1**). Wartości IC_{50} obrazują, że aktywność **TOS-1** jest porównywalna do tej jaką wykazują aksytynib i imatynib. Dalsze plany badawcze obejmują modyfikacje struktury kandydata TOS-1, w zamierzeniu poprawy jego efektywności względem obu celów molekularnych oraz prześwieceniu aktywności względem innych ważnych celów białkowych regulujących metabolizm komórki.

Rysunek S1. Porównanie aktywności znanych inhibitorów kinazy ABL1 z aktywnością inhibitora TOS-2, który hamuje także białko IDH1 *in vivo*.



Na poniższym schemacie przedstawiono opracowaną metodę otrzymywania związków o strukturze TOS-2. Charakterystyczne w ich budowie jest występowanie amidu kwasu sulfonowego oraz amidu kwasu karboksylowego. Zróżnicowane reaktywności sfunkcjonalizowanego ugrupowania karboksylowego oraz sulfonowego wykorzystać można do zaprojektowania sekwencyjnej metody syntezy.

(1) 2-[(E)-2-(2-acetoksyfenilo)etenilo]chinazol-4(3H)-on

Związek **1** otrzymano w postaci białego proszku z wydajnością 43 % (651 mg), t_{top} 235 – 243 °C, using 610 mg of 2-hydroxybenzaldehyde. ^1H NMR (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ): 12,47 (s, 1H, N-H), 8,13 (dd, $J = 7,8$, 1,1 Hz, 1H, Ar-H), 7,92 (d, $J = 16,4$ Hz, 1H, C=C-H), 7,83 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, Ar-H), 7,82 (ddd, $J = 8,3$, 7,6, 1,0 Hz, 1H, Ar-H), 7,70 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, Ar-H), 7,50 (ddd, $J = 8,6$, 7, 1,1 Hz, 1H, Ar-H), 7,48 (apptd, $J = 7,8$, 1,4 Hz, 1H, Ar-H), 7,37 (appt, $J = 7,6$ Hz, 1H, Ar-H), 7,24 (dd, $J = 8,0$, 0,9 Hz, 1H, Ar-H), 7,03 (d, $J = 16,3$ Hz, 1H, C=C-H), 2,43 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ): 169,76, 162,27, 151,65, 149,42, 149,34, 134,95, 132,04, 131,12, 128,17, 128,08, 127,79, 126,99, 126,89, 126,33, 124,01, 121,67, 21,43; HRMS (ESI) obliczono dla $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ 305,0932; znaleziono 305,0928.

(2) 2-[(E)-2-(3-acetoksyfenilo)etenilo]chinazol-4(3H)-on

Związek **2** otrzymano w postaci białego proszku z wydajnością 48 % (725 mg), t_{top} 238 °C, using 610 mg of 3-hydroxybenzaldehyde. ^1H NMR (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ): 12,33 (s, 1H, N-H), 8,12 (ddd, $J = 8,0$, 1,6, 0,8 Hz, 1H, Ar-H), 7,94 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, C=C-H), 7,82 (ddd, $J = 7,8$, 7,2, 1,7 Hz, 1H, Ar-H), 7,69 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, Ar-H), 7,56 (dd, $J = 7,6$, 1,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,51 (appt, $J = 7,9$ Hz), 7,50 (ddd, $J = 7,6$, 7,2, 1,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,45 (dd, $J = 2,2$, 1,9 Hz, 1H, Ar-H), 7,19 (ddd, $J = 7,9$, 2,4, 1,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,03 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, C=C-H), 2,32 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ): 169,66, 162,16, 151,67, 151,47, 149,40, 137,69, 137,07, 135,04, 130,64, 127,68, 126,86, 126,36, 125,69, 123,63, 122,69, 121,64, 121,02, 21,38; HRMS (ESI) obliczono dla $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ 305,0932; znaleziono 305,0929.

(3) 2-[(E)-2-(2,4-diacetoksyfenilo)etenilo]chinazol-4(3H)-on

Związek **3** otrzymano w postaci a brązowego proszku z wydajnością 16% (290 mg), t_{top} 233 °C, using 690 mg of 2,4-dihydroxybenzaldehyde. ^1H NMR (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ): 12,48 (s, 1H, N-H), 8,13 (dd, $J = 8,0$, 1,0 Hz, 1H, Ar-H), 7,89 (d, $J = 16,6$ Hz, 1H, C=C-H), 7,87 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, Ar-H), 7,82 (ddd, $J = 7,6$, 7,2, 1,5 Hz, 1H, Ar-H), 7,70 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, Ar-H), 7,50 (ddd, $J = 8,4$, 7,6, 1,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,18 (dd, $J = 8,6$, 2,3 Hz, 1H, Ar-H), 7,14 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, Ar-H), 7,02 (d, $J = 16,4$ Hz, 1H, C=C-H), 2,43 (s, 3H, CH_3), 2,30 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ): 169,52, 169,28, 162,28, 152,03, 151,63, 149,71, 149,32, 134,95, 131,36, 128,79, 127,77, 126,89, 126,33, 125,89, 123,98, 121,66, 120,73, 117,74, 21,39, 21,28; HRMS (ESI) obliczono dla $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ 363,0986; znaleziono 363,0986.

(4) 2-[(E)-2-(2-metoksyfenilo)etenilo]chinazol-4(3H)-on

Związek **4** otrzymano w postaci a jasnożółtego puszystego ciała stałego z wydajnością 25% (351 mg), t_{top} 226 – 229 °C (lit.[4] t_{top} 234 – 236 °C), using 680 mg of 2-methoxybenzaldehyde. ^1H NMR (400 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ): 12,34 (s, 1H, N-H), 8,17 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, C=C-H), 8,11 (dd, $J = 8,0$, 1,6 Hz, 1H, Ar-H), 7,82 (ddd, $J = 8,0$, 7,2, 1,6 Hz, 1H, Ar-H), 7,69 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, Ar-H), 7,62 (dd, $J = 7,7$, 1,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,47 (ddd, $J = 7,7$, 7,2, 0,8 Hz, 1H, Ar-H), 7,41 (ddd, $J = 8,0$, 7,6, 1,6 Hz, 1H, Ar-H), 7,12 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, Ar-H), 7,08 (d, $J = 16,4$ Hz, 1H, C=C-H), 7,04 (appt, $J = 7,6$ Hz, 1H), 3,92 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (126 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ): 162,3, 158,2, 152,3, 149,5, 134,9, 134,1, 131,7, 128,6, 127,6, 126,5, 126,3, 123,8, 121,8, 121,5, 121,3, 112,2, 56,1; HRMS (ESI) obliczono dla $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ 277,0981; znaleziono 277,0981.

(5) 2-[(E)-2-(3-metoksyfenilo)etenilo]chinazol-4(3H)-on

Związek **5** otrzymano w postaci kremowego ciała stałego z wydajnością 18 % (244 mg), t_{top} 226 – 234 °C (lit.[4] t_{top} 239 – 241 °C), using 680 mg of 3-methoxybenzaldehyde. ^1H NMR (400 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ): 12,31 (br s, 1H, N-H), 8,12 (dd, $J = 7,9$, 1,3 Hz, 1H, Ar-H), 7,93 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, C=C-H), 7,82 (ddd, $J = 8,4$, 7,2, 1,6 Hz, 1H, Ar-H), 7,68 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,49 (ddd, $J = 7,5$, 6,4, 0,8 Hz, 1H, Ar-H), 7,38 (appt, $J = 7,9$ Hz, 1H), 7,24 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, Ar-H), 7,23 (s, 1H, Ar-H), 7,03 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, C=C-H), 7,00 (ddd, $J = 8,0$, 1,9, 1,4 Hz, 1H, Ar-H), 3,83 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (126 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ): 162,1, 160,3, 151,9,

149,5, 138,7, 137,0, 134,8, 130,5, 127,6, 126,6, 126,3, 122,1, 121,7, 120,5, 116,1, 113,2, 55,7; HRMS (ESI) obliczono dla $C_{17}H_{14}N_2O_2$ $[M - H]^-$ 277,0981; znaleziono 277,0979.

(6) 2-[(E)-2-(4-metoksyfenylo)etenyl]chinazol-4(3H)-on

Związek **6** otrzymano w postaci jasnożółtego ciała stałego z wydajnością 12% (172 mg), t_{top} 275-281 °C (lit.[4] t_{top} 280 – 281 °C), using 680 mg of 4-methoxybenzaldehyde. 1H NMR (400 MHz; $(CD_3)_2SO$, δ): 12,27 (br s, 1H, N-H), 8,10 (dd, $J = 7,9, 1,1$ Hz, 1H, Ar-H), 7,92 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, C=C-H), 7,80 (ddd, $J = 8,2, 7,5, 1,6$ Hz, 1H, Ar-H), 7,66 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, Ar-H), 7,62 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, Ar-H), 7,47 (appt, $J = 7,5$ Hz, 1H, Ar-H), 7,03 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, Ar-H), 6,86 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, C=C-H), 3,82 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz; $(CD_3)_2SO$, δ): 162,2, 161,2, 152,2, 149,7, 138,5, 134,8, 129,7, 129,7, 128,2, 127,5, 126,3, 126,3, 121,5, 119,1, 115,1, 115,1, 55,8; HRMS (ESI) obliczono dla $C_{17}H_{14}N_2O_2$ $[M - H]^-$ 277,0981; znaleziono 277,0980.

(7) 2-[(E)-2-(2-etoksyfenylo)etenyl]chinazol-4(3H)-on

Związek **7** otrzymano w postaci jasnożółtych igieł z wydajnością 49% (713 mg), t_{top} 225 °C, using 750 mg of 2-ethoxybenzaldehyde. 1H NMR (500 MHz, $(CD_3)_2SO$, δ): 12,32 (s, 1H, N-H), 8,15 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, C=C-H), 8,11 (dd, $J = 7,9, 1,4$ Hz, 1H, Ar-H), 7,80 (ddd, $J = 8,1, 7,1, 1,5$ Hz, 1H, Ar-H), 7,68 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,61 (d, $J = 7,7, 1,6$ Hz, 1H, Ar-H), 7,47 (ddd, $J = 8,1, 7,1, 1,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,38 (ddd, $J = 8,4, 7,3, 2,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,10 (dd, $J = 8,0, 0,7$ Hz, 1H, Ar-H), 7,09 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, C=C-H), 7,02 (apptd, $J = 7,5, 0,8$ Hz, 1H, Ar-H), 4,18 (q, 6,8 Hz, 2H, CH_2CH_3), 1,45 (t, $J = 6,8$ Hz, 3H, CH_2CH_3); ^{13}C NMR (125 MHz, $(CD_3)_2SO$, δ): 162,35, 157,60, 152,36, 149,55, 134,95, 134,53, 131,66, 129,19, 127,63, 126,49, 126,31, 123,94, 121,87, 121,50, 121,21, 113,13, 64,26, 15,14; HRMS (ESI) obliczono dla $C_{18}H_{16}N_2O_2$ $[M - H]^-$ 291,1139; znaleziono 291,1136.

(8) 2-[(E)-2-(4-etoksyfenylo)etenyl]chinazol-4(3H)-on

Związek **8** otrzymano w postaci białego proszku z wydajnością 12 % (182 mg), t_{top} 275 – 279 °C, using 750 mg of 4-ethoxybenzaldehyde. 1H NMR (400 MHz; $(CD_3)_2SO$, δ): 12,25 (s, 1H, N-H), 8,10 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, Ar-H), 7,91 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H, C=C-H), 7,80 (appt, $J = 7,5$ Hz, 1H, Ar-H), 7,66 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, Ar-H), 7,61 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, Ar-H), 7,46 (appt, $J = 7,4$ Hz, 1H, Ar-H), 7,02 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, Ar-H), 6,85 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, C=C-H), 4,09 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 1,35 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H, CH_2CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz; $(CD_3)_2SO$, δ): 162,2, 160,4, 152,2, 149,7, 138,6, 134,8, 129,7, 128,1, 127,5, 126,3, 126,29, 121,5, 119,1, 115,6, 63,8, 15,0; HRMS (ESI) obliczono dla $C_{18}H_{16}N_2O_2$ $[M - H]^-$ 291,1139; znaleziono 291,1135.

(9) 2-[(E)-2-(4-butoksyfenylo)etenyl]chinazol-4(3H)-on

Związek **9** otrzymano w postaci białego proszku z wydajnością 20 % (319 mg), t_{top} 219 °C, stosując 890 mg of 4-butoxybenzaldehyde. 1H NMR (400 MHz, $(CD_3)_2SO$, δ): 12,25 (s, 1H, N-H), 8,10 (dd, $J = 7,9, 1,5$ Hz, 1H, Ar-H), 7,91 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H, C=C-H), 7,80 (ddd, $J = 8,3, 7,0, 1,4$ Hz, 1H, Ar-H), 7,66 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,60 (appd, $J = 8,8$ Hz, 2H, Ar-H), 7,46 (ddd, $J = 8,0, 7,0, 1,1$ Hz, 1H, Ar-H), 7,02 (appd, $J = 8,0$ Hz, 2H, Ar-H), 6,85 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H, C=C-H), 4,03 (t, $J = 8$ Hz, 2H, $CH_2CH_2CH_2CH_3$), 1,68-1,75 (m, 2H, $CH_2CH_2CH_2CH_3$), 1,40-1,50 (m, 2H, $CH_2CH_2CH_2CH_3$), 0,95 (t, $J = 4$ Hz, 3H, $CH_2CH_2CH_2CH_3$); ^{13}C NMR (125 MHz, $(CD_3)_2SO$, δ): 162,25, 160,59, 155,22, 149,62, 138,59, 134,57, 132,62, 129,79, 127,91, 127,48, 126,43, 126,32, 121,42, 118,79, 115,49, 114,35, 67,82, 31,13, 19,19, 14,16; HRMS (ESI) obliczono dla $C_{20}H_{20}N_2O_2$ $[M - H]^-$ 319,1452; znaleziono 319,1449.

(10) 2-[(E)-2-(2H-1,3-benzodioksol-4-yl)etenyl]chinazol-4(3H)-one

Związek **10** otrzymano w postaci białego puszystego ciała stałego z wydajnością 26 % (378 mg), t_{top} 323 °C, używając 750 mg of 2H-1,3-benzodioksolo-4-karbaldehydu. 1H NMR (400 MHz, $(CD_3)_2SO$, δ): 12,39 (s, 1H, N-H), 8,11 (dd, $J = 7,9, 1,4$ Hz, 1H, Ar-H), 7,90 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, C=C-H), 7,81, (ddd, $J = 7,9, 7,3,$

1,6 Hz, 1H, Ar-H), 7,69 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, Ar-H), 7,48 (ddd, $J = 7,5, 7,2, 0,9$ Hz, 1H, Ar-H), 7,14 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, C=C-H), 7,09 (dd, $J = 7,8, 1,2$ Hz, 1H, Ar-H), 6,97 (dd, $J = 7,7, 1,3$ Hz, 1H, Ar-H), 6,93 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H, Ar-H), 6,19 (s, 2H, OCH₂O); ¹³C NMR (125 MHz, (CD₃)₂SO, δ): 162,16, 151,95, 149,46, 148,18, 146,30, 134,92, 133,20, 127,68, 126,69, 126,31, 123,95, 122,56, 122,23, 121,65, 118,14, 109,83, 101,98; HRMS (ESI) obliczono dla C₁₇H₁₂N₂O₃ [M – H][–] 291,0775; znaleziono 291,0772.

(11) 2-[(E)-2-(2H-1,3-benzodioksol-5-ylo)etenyl]chinazol-4(3H)-on

Związek **11** otrzymano w postaci jasnobrązowego ciała stałego z wydajnością 75 % (1091 mg), t_{top} 275 °C (lit.[229] t_{top} 311 °C), używając 750 mg 2H-1,3-benzodioksolo-5-karbaldehydu. ¹H NMR: (500 MHz; (CD₃)₂SO, δ): 12,24 (s, 1H, N-H), 8,10 (dd, $J = 7,9, 1,3$ Hz, 1H), 7,86 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H, C=C-H), 7,80 (ddd, $J = 8,3, 7,0, 1,5$ Hz, 1H), 7,65 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, Ar-H), 7,47 (ddd, $J = 7,9, 7,1, 1,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,28 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H, Ar-H), 7,15 (dd, $J = 8,2, 1,6$ Hz, 1H, Ar-H), 7,00 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 6,84 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H, C=C-H), 6,10 (s, 2H, OCH₂O); ¹³C NMR (126 MHz; (CD₃)₂SO, δ): 162,2, 152,1, 149,5, 149,3, 148,6, 138,6, 134,9, 129,9, 127,5, 126,49, 126,30, 124,2, 121,4, 119,6, 109,2, 106,6, 102,0. HRMS (ESI) obliczono dla C₁₇H₁₂N₂O₃ [M – H][–] 291,0775; znaleziono 291,0772.

(12) 2-[(E)-2-(5-bromo-2H-1,3-benzodioksol-4-ylo)ethenyl]chinazol-4(3H)-on

Związek **12** otrzymano w postaci białego ciała stałego z wydajnością 40 % (736 mg), t_{top} 301 °C, używając 1160 mg 5-bromo-2H-1,3-benzodioksolo-4-karbaldehydu. ¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ): 12,55 (s, 1H, N-H), 8,11 (dd, $J = 7,5, 1,5$ Hz, 1H, Ar-H), 8,09 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, C=C-H), 7,82 (ddd, $J = 8,3, 7,0, 1,4$ Hz, 1H, Ar-H), 7,70 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, Ar-H), 7,50 (ddd, $J = 7,2, 7,5, 1,2$ Hz, 1H, Ar-H), 7,35 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, C=C-H), 7,24 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, Ar-H), 6,95 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, Ar-H), 6,27 (s, 2H, OCH₂O); ¹³C NMR (125 MHz, (CD₃)₂SO, δ): 162,19, 151,73, 149,28, 149,08, 147,91, 147,64, 135,02, 132,52, 127,83, 127,11, 126,91, 126,33, 121,71, 117,79, 115,58, 110,78, 103,03; HRMS (ESI) obliczono dla C₁₇H₁₁BrN₂O₃ [M – H][–] 368,9880; znaleziono 368,9879.

(13) 2-[(E)-2-(6-bromo-2H-1,3-benzodioksol-5-ylo)etenyl]chinazol-4(3H)-on

Związek **13** otrzymano w postaci białego ciała stałego z wydajnością 33 % (607 mg), t_{top} 314 – 317 °C, używając 1160 mg 6-bromo-2H-1,3-benzodioksolo-5-karbaldehydu. ¹H NMR (400 MHz; (CD₃)₂SO, δ): 12,28 (s, 1H, N-H), 8,11 (dd, $J = 7,6, 1,4$ Hz, 1H, Ar-H), 8,10 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, C=C-H), 7,81 (ddd, $J = 8,1, 7,3, 1,5$ Hz, 1H, Ar-H), 7,68 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, Ar-H), 7,49 (ddd, $J = 7,6, 7,1, 1,5$ Hz, 1H, Ar-H), 7,35 (s, 1H, Ar-H), 7,31 (s, 1H, Ar-H), 6,88 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, C=C-H), 6,15 (s, 2H, OCH₂O); ¹³C NMR (125 MHz, (CD₃)₂SO, δ): 162,17, 151,69, 150,12, 149,44, 148,50, 136,49, 134,96, 128,59, 127,72, 126,75, 126,33, 123,05, 121,6, 116,92, 113,29, 106,72, 103,04; HRMS (ESI) obliczono dla C₁₇H₁₁BrN₂O₃ [M – H][–] 368,9880; znaleziono 368,9875.

(14) 2-[(E)-2-(3-nitrofenyl)etenyl]chinazol-4(3H)-on

Związek **14** otrzymano w postaci żółtego ciała stałego z wydajnością 67 % (978 mg), t_{top} 356 – 358 °C, używając 760 mg 3-nitrobenzaldehydu. ¹H NMR (400 MHz; (CD₃)₂SO, δ): 12,36 (s, 1H, N-H), 8,48 (s, 1H, Ar-H), 8,25 (dd, $J = 8,3, 1,7$ Hz, 1H, Ar-H), 8,14 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, Ar-H), 8,14 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, Ar-H), 8,07 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, C=C-H), 7,84 (appt, $J = 7,2$ Hz, 1H, Ar-H), 7,77 (appt, $J = 8,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,71 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, Ar-H), 7,52 (appt, $J = 7,5$ Hz, 1H, Ar-H), 7,21 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, C=C-H); ¹³C NMR (126 MHz; (CD₃)₂SO, δ): 162,0, 151,4, 149,0, 137,4, 136,3, 134,9, 134,1, 131,0, 127,7, 127,0, 126,4, 124,7, 124,3, 122,2, 122,2, 121,8, 31,0; HRMS (ESI) obliczono dla C₁₆H₁₁N₃O₃ [M – H][–] 292,0728; znaleziono 292,0724.

(15) 2-[(E)-2-(4-nitrofenyl)etenyl]chinazol-4(3H)-on

Związek **15** otrzymano w postaci żółtego ciała stałego z wydajnością 81 % (1182 mg), t_{top} 365 – 366 °C, używając 760 mg 4-nitrobenzaldehydu. ¹H NMR (400 MHz; (CD₃)₂SO, δ): 12,44 (s, 1H, N-H), 8,31 (d, $J =$

8,8 Hz, 2H, Ar-H), 8,14 (dd, $J = 7,9$, 1,3 Hz, 1H, Ar-H), 8,05 (d, $J = 16,3$ Hz, 1H, C=C-H), 7,94 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, Ar-H), 7,84 (ddd, $J = 8,2$, 7,2, 1,3 Hz, 1H, Ar-H), 7,72 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, Ar-H), 7,53 (ddd, $J = 7,2$, 7,0, 0,9 Hz, 1H, Ar-H), 7,21 (d, $J = 16,3$ Hz, 1H, C=C-H); ^{13}C NMR (101 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ): 162,1, 151,2, 149,2, 148,0, 142,0, 136,2, 135,1, 129,1, 129,1, 127,8, 127,2, 126,4, 125,9, 124,7, 124,7, 121,8; HRMS (ESI) obliczono dla $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ 292,0728; znaleziono 292,0724.

(17) 7-chloro-2-[(E)-2-(furan-2-ylo)etenyl]chinazol-4(3H)-on

Związek **17** otrzymano w postaci jasnożółtego ciała stałego z wydajnością 88 %. ^1H NMR (500 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 12,47 (br s, 1H), 8,07 (d, $J = 8,8$, 1H), 7,88 (s, 1H), 7,79 (d, $J = 15,8$, 1H), 7,66 (d, $J = 2,0$, 1H), 7,48 (dd, $J = 8,5$, 2,1, 1H), 6,93 (d, $J = 3,3$ Hz, 1H), 6,74 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H), 6,66 (dd, $J = 3,4$, 1,8 Hz, 1H). t_{top} . 267-268; HRMS (ESI) obliczono dla $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 273,0425; znaleziono 273,0429.

(18) 2-methyl-4-[(E)-2-(4-okso-3,4-dihydrochinazolin-2-ylo)etenyl]fenylo 6-bromo-2H-1,3-benzodioksol-5-sulfonian

Do **19** (294 mg; 1 mmol) w 10 mL CH_2Cl_2 dodano chlorek 6-bromobenzo[d][1,3]dioksolo-5-sulfonylu (300 mg; 1 mmol), oraz $\text{NEt}(i\text{-Pr})_2$ (129 mg; 1 mmol). Mieszaninę reakcyjną pozostawiono do mieszanania w temperaturze pokojowej przez 8 h. Wydzielano stosując rozdział chromatograficzny (kartridż 80 g silica gel), stosując jako fazę ruchomą CH_2Cl_2 . Otrzymano 417 mg białego ciała stałego z wydajnością 75 %. ^1H NMR (500 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 12,32 (s, 1H), 8,11 (dd, $J = 7,9$, 1,4 Hz, 1H), 7,90 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H), 7,82 (ddd, $J = 8,3$, 7,0, 1,4 Hz, 1H), 7,67 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,64 (s, 1H), 7,50 (ddd, $J = 8,0$, 7,1, 1,0 Hz, 1H), 7,44 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H), 7,37 (s, 1H), 7,20 (dd, $J = 8,4$, 1,9 Hz, 1H), 7,07 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 7,03 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H), 6,25 (s, 2H), 3,73 (s, 3H).

(19) 2-[(E)-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)etenyl]quinazolin-4(3H)-one

Związek **19** otrzymano w postaci jasnożółtego ciała stałego z wydajnością 88 % (reakcja w AcOH), stosując 760 mg waniliny. ^1H NMR (500 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 12,18 (s, 1H), 9,59 (s, 1H), 8,10-8,08 (m, 1H), 7,87 (d, $J = 16,1$, 1H), 7,79 (td, $J = 7,7$, 2,1 Hz, 1H), 7,64 (ddd, $J = 8,3$, 1,25, 0,6 Hz, 1H), 7,45 (ddd, $J = 8,0$, 7,0, 1,1 Hz, 1H), 7,25 (d, $J = 2,0$, 1H), 7,09 (dd, $J = 8,3$, 2,0 Hz, 1H), 6,85 (d, $J = 3,4$ Hz, 1H), 6,83 (d, $J = 11,4$ Hz, 1H), 3,85 (s, 3H).

(20) 2-[(E)-2-(2,4-dimethoxyphenyl)etenyl]quinazolin-4(3H)-one

Związek **20** otrzymano w postaci jasnożółtego ciała stałego z wydajnością 78 % (reakcja w AcOH), stosując 830 mg aldehydu 2,4-dimetoksybenzoesowego. ^1H NMR (500 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 12,25 (s, 1H), 8,09 (dd, $J = 8,1$, 1,5 Hz, 1H), 8,08 (d, $J = 16,1$ Hz, 2H), 7,78 (ddd, $J = 8,3$, 7,0, 1,4 Hz, 1H), 7,66 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,55 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,46-7,43 (m, 1H), 6,96 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H), 6,66-6,63 (m, 2H), 3,92 (s, 3H), 3,84 (s, 3H).

(21) 2-[(E)-2-(3-chlorophenyl)etenyl]quinazolin-4(3H)-one

Związek **21** otrzymano w postaci białego ciała stałego z wydajnością 35 % (492 mg), t_{top} 269 - 272 °C (lit.[36] t_{top} 289 °C), stosując 700 mg 3-chlorobenzaldehydu. ^1H NMR (400 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ): 12,33 (s, 1H, N-H), 8,13 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, Ar-H), 7,92 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H, C=C-H), 7,83 (appt, $J = 7,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,74 (s, 1H, Ar-H), 7,69 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, Ar-H), 7,64 (d, $J = 6,6$ Hz, 1H, Ar-H), 7,53-7,47 (m, 3H, Ar-H), 7,07 (d, $J = 16,3$ Hz, 1H, C=C-H); ^{13}C NMR (126 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ): 162,1, 151,6, 149,4, 137,9, 137,1, 134,9, 134,3, 131,3, 129,7, 127,7, 127,6, 126,8, 126,6, 126,3, 123,5, 121,7; HRMS (ESI) obliczono dla $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ = 281,0487; znaleziono 281,0487.

Estry benzenosulfonowe

Związki **1a-10a** zostały otrzymane według jednej ogólnej procedury. Chlorek 4-metylobenzenosulfonowy stosowano z dwukrotnym nadmiarem. Pozostałe chlorki sulfonowe były stosowane w ilości równomolowej. Chlorki dodawano do zawiesiny 2-styrylochinazolonu w CH₂Cl₂ (10 mL/1 mmol substratu). W dalszej kolejności dodawano zasady organicznej - Et₃N lub NEt(iPr)₂. Jako ostatni dodawano DMAP (5 mol%). Pozostawiono do mieszania do momentu w którym mieszanina ulegała homogenizacji lub przerywano reakcję po 16 h. W przypadku mieszaniny poreakcyjnej o objętości przekraczającej 5 mL, zmniejszano jej objętość na wyparce pod zmniejszonym ciśnieniem i rozdzielano na kolumnie chromatograficznej flash (80 g - 120 g) stosując CH₂Cl₂ lub przepływ gradientowy CH₂Cl₂ → EtOAc (50 %). Sporządzono płytkę TLC w celu identyfikacji ewentualnych pozostałości substratu i wypadku pozytywnego rezultatu, po odparowaniu eluentów, produkty przemywano porcją 2-propanolu (1 mL). Produkty suszono na powietrzu bez dostępu światła.

(1a) [2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]chinazolin-4-ylo] 4-metylobenzenosulfonian

Związek **1a** otrzymano w postaci białego proszku z wydajnością 72 % (311 mg), *t*_{top} 168 – 174 °C, używając 278 mg związku **4**. ¹H NMR (400 MHz; (CD₃)₂SO, δ): 8,27 (d, *J* = 16,3 Hz, 1H, C=C-H), 8,15 (dd, *J* = 7,9, 1,5 Hz, 1H, Ar-H), 7,89 (ddd, *J* = 8,4, 7,1, 1,4 Hz, 1H, Ar-H), 7,74 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, Ar-H), 7,63 (dd, *J* = 7,8, 1,5 Hz, 1H, Ar-H), 7,57 (ddd, *J* = 7,6, 7,4, 1,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,49 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H, Ar-H), 7,48 (apptd, *J* = 8,5, 1,8 Hz, 1H, Ar-H), 7,17 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H, Ar-H), 7,16 (d, *J* = 16,4 Hz, 1H, C=C-H), 7,12 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H, Ar-H), 7,08 (apptd, *J* = 7,5, 0,7 Hz, 1H, Ar-H), 3,94 (s, 3H, CH₃), 2,29 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (126 MHz; (CD₃)₂SO, δ): 161,0, 159,1, 154,4, 145,8, 139,7, 139,7, 138,4, 135,9, 133,1, 129,9, 128,6, 128,6, 127,8, 126,9, 126,0, 126,0, 123,3, 121,5, 120,6, 117,6, 112,8, 56,4, 21,2.

(3a) [2-[(E)-2-(4-metoksyfenylo)etenylo]chinazolin-4-ylo] 4-metylobenzenosulfonian

Związek **3a** otrzymano w postaci białego ciała stałego z wydajnością 43 % (188 mg), *t*_{top} 174 – 178 °C, stosując 278 mg związku **6**. ¹H NMR (400 MHz; (CD₃)₂SO, δ): 8,16 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H, Ar-H), 8,15 (d, *J* = 16,4 Hz, 1H, C=C-H), 7,92 (ddd, *J* = 7,7, 6,3, 1,5 Hz, 1H, Ar-H), 7,75 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, Ar-H), 7,67 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, Ar-H), 7,60 (ddd, *J* = 7,5, 7,2, 1,0 Hz, 1H, Ar-H), 7,55 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H, Ar-H), 7,13 (d, *J* = 7,9 Hz, 2H, Ar-H), 7,08 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, Ar-H), 6,95 (d, *J* = 16,2 Hz, 1H, C=C-H), 3,85 (s, 3H, CH₃), 2,30 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (126 MHz; (CD₃)₂SO, δ): 162,4, 160,8, 154,3, 145,8, 144,3, 143,0, 138,4, 136,1, 130,8, 128,6, 127,9, 127,2, 126,9, 126,0, 122,8, 120,4, 115,4, 113,8, 56,0, 21,2.

(4a) [2-[(E)-2-(2,4-dimetoksyfenylo)etenylo]chinazolin-4-ylo] 4-metylobenzenosulfonian

Związek **4a** otrzymano w postaci białego ciała stałego z wydajnością 43 %, stosując 308 mg związku **20**. ¹H NMR (500 MHz; (CD₃)₂SO): δ 8,21 (d, *J* = 16,2 Hz, 1H), 8,13 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,88 (appt, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,71 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 7,57 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,55 (appt, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,48 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 7,12 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H), 7,02 (d, *J* = 16,2 Hz, 1H), 6,70 (s, 1H), 6,69 (dd, *J* = 8,5, 2,0 Hz, 1H), 3,94 (s, 3H), 3,86 (s, 3H), 2,29 (s, 3H); HRMS (ESI) obliczono dla C₂₅H₂₂N₂O₅S [M+H]⁺ 463,1322; znaleziono 463,1325.

(5a) 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]chinazolin-4-ylo 2*H*-1,3-benzodioksol-5-sulfonian

Związek **5a** otrzymano w postaci białego ciała stałego z wydajnością 59 %, stosując 139 mg związku **4**. ¹H NMR (500 MHz; (CD₃)₂SO): δ 8,26 (d, *J* = 16,3 Hz, 1H), 8,14 (ddd, *J* = 7,9, 1,6, 0,4 Hz, 1H), 7,89 (ddd, *J* = 8,3, 7,1, 1,4 Hz, 1H), 7,73 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,63 (dd, *J* = 7,7, 1,7 Hz, 1H), 7,56 (ddd, *J* = 8,0, 7,1, 1,0 Hz, 1H), 7,47 (ddd, *J* = 8,4, 7,3, 1,7 Hz, 1H), 7,17 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,15 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 7,13 (dd, *J* = 8,0, 1,5 Hz, 1H), 7,08 (appt, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,04 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H), 6,82 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,01 (s, 2H), 3,94 (s, 3H)

HRMS obliczono dla C₂₄H₁₈N₂O₆S [M-H]⁻ 461,0813; znaleziono 461,0821.

(6a) [2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenyl]chinazolin-4-ylo] 6-bromo-1,3-benzodioksol-5-sulfonian

Związek **6a** otrzymano w postaci białego ciała stałego z wydajnością 66 %, stosując 139 mg związku **4**. ^1H NMR (500 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 8,11 (dd, $J = 7,9, 1,4$ Hz, 1H), 7,90 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H), 7,82 (ddd, $J = 8,3, 7,0, 1,4$ Hz, 1H), 7,67 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,64 (s, 1H), 7,50 (ddd, $J = 8,0, 7,1, 1,0$ Hz, 1H), 7,44 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H), 7,37 (s, 1H), 7,20 (dd, $J = 8,5, 1,9$ Hz, 1H), 7,07 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 7,03 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H), 6,25 (s, 2H), 3,73 (s, 3H).

(7a) [2-[(E)-2-(2-acetoksyfenylo)etenyl]chinazolin-4-ylo] 4-metylobenzenosulfonian

Związek **7a** otrzymano w postaci białego ciała stałego z wydajnością 58 % (266 mg), t_{top} 135 – 141 °C, stosując 306 mg związku **1**. ^1H NMR (400 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ): 8,17 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, Ar-H), 8,05 (d, $J = 16,4$ Hz, 1H, C=C-H), 7,91 (appt, $J = 7,7$ Hz, 1H, Ar-H), 7,85 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, Ar-H), 7,75 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, Ar-H), 7,60 (appt, $J = 7,6$ Hz, 1H, Ar-H), 7,54 (appt, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,51 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, Ar-H), 7,41 (appt, $J = 7,5$ Hz, 1H, Ar-H), 7,28 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,13 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, Ar-H), 7,10 (d, $J = 16,8$ Hz, 1H, C=C-H), 2,44 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{COO}-$), 2,29 (s, 3H, Ar- CH_3); ^{13}C NMR (126 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ): 169,7, 161,4, 152,9, 149,8, 145,9, 138,2, 135,7, 135,3, 132,0, 128,5, 128,5, 128,2, 127,74, 127,62, 127,1, 126,7, 126,0, 126,0, 125,06, 125,02, 124,1, 121,1, 21,4, 21,2.

(8a) [2-[(E)-2-(6-bromo-1,3-benzodioksol-5-ylo)etenyl]chinazolin-4-ylo] 4-metylobenzenosulfonian

Związek **8a** otrzymano w postaci a jasnożółtego ciała stałego z wydajnością 26 % (136 mg), t_{top} 184 – 186 °C, stosując 370 mg związku **13**. ^1H NMR (400 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ): 8,12 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, Ar-H), 8,10 (d, $J = 16,5$ Hz, 1H, C=C-H), 7,82 (appt, $J = 8,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,50 (appt, $J = 7,4$ Hz, 1H, Ar-H), 7,48 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H, Ar-H), 7,37 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H, Ar-H), 7,12 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, Ar-H), 6,89 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H, C=C-H), 6,17 (s, 2H, OCH_2O), 2,29 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (126 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ): 161,5, 152,8, 150,7, 148,6, 146,0, 139,2, 138,2, 135,5, 130,2, 128,5, 128,5, 128,1, 127,5, 126,6, 126,0, 126,0, 125,2, 121,1, 120,4, 117,7, 113,4, 106,8, 103,2, 21,2.

(9a) [2-[(E)-2-(3-nitrofenylo)etenyl]chinazolin-4-ylo] 4-metylobenzenosulfonian

Związek **9a** otrzymano w postaci żółtego ciała stałego z wydajnością 35 % (156 mg), t_{top} 197 – 200 °C, stosując 293 mg związku **14**. ^1H NMR (400 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ): 8,45 (s, 1H, Ar-H), 8,26 (dd, $J = 7,6, 1,8$ Hz, 1H, Ar-H), 8,25 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, Ar-H), 8,19 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, Ar-H), 8,17 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, Ar-H), 8,11 (appt, $J = 8,1$ Hz, 1H, Ar-H), 8,04 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, Ar-H), 7,82 (appt, $J = 7,6$ Hz, 1H, Ar-H), 7,77 (appt, $J = 7,3$ Hz, 1H, Ar-H), 7,62 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, Ar-H), 7,60 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, C=C-H), 7,51 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, C=C-H), 2,48 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (126 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ): 162,0, 151,5, 149,02, 148,86, 146,5, 137,9, 137,4, 136,7, 135,0, 134,1, 131,1, 128,4, 128,4, 127,4, 127,1, 126,4, 126,0, 126,0, 124,38, 124,33, 122,2, 121,7, 21,2.

(10a) [2-[(E)-2-(3-chlorofenylo)etenyl]etenyl]chinazolin-4-ylo] 4-metylobenzenosulfonian

Związek **10a** otrzymano w postaci białego ciała stałego z wydajnością 43 % (188 mg), t_{top} 178 – 182 °C, stosując 282 mg związku **16**. ^1H NMR (400 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ): 8,17 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, Ar-H), 8,16 (ddd, $J = 7,8, 7,2, 1,2$ Hz, 1H, Ar-H), 8,09 (appt, $J = 7,3$ Hz, 1H, Ar-H), 8,02 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, Ar-H), 7,83 – 7,78 (m, 2H, Ar-H), 7,70 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H, Ar-H), 7,60 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, Ar-H), 7,51 (appt, $J = 8,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,49 (s, 1H, Ar-H), 7,47 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, C=C-H), 7,38 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, C=C-H); ^{13}C NMR (126 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ): 161,4, 152,7, 145,8, 139,9, 138,3, 137,2, 135,6, 134,4, 131,5, 130,5, 128,6, 128,6, 127,9, 127,7, 127,0, 126,7, 126,0, 126,0, 125,2, 121,1, 120,8, 21,2.

4-Aminochinazoliny

Związki **1b** – **16b** otrzymano w reakcji pomiędzy aminami oraz 4-metylobenzenosulfonowymi pochodnymi styrylochinazoliny. Aminy stosowano w stosunku stechiometrycznym 1,05 ekwiwalentu względem prekursora serii a. Reakcję prowadzono w mieszaninie 2-propanolu i CH₂Cl₂ (10:2). Po 24 h dodawano 10 mL wodnego nasyconego roztworu NaHCO₃, pozostawiono do mieszania przez 30 minut a następnie usuwano lotne frakcje na wyparce pod zmniejszonym ciśnieniem do momentu, w którym z roztworu wytrąca się osad. Produkt sączono i przemywano eterem dietylowym. Suszono na powietrzu.

(1b) 2-[(E)-2-{4-[(2-jodofenyl)amino]chinazolin-2-yl}etenyl]fenyl octan

Związek **1b** otrzymano w postaci jasno żółtego osadu z wydajnością 52 % (66 mg), *t*_{top}: 160 – 162 °C, stosując 115 mg związku **1a** and 2-iodoaniline (66 mg, 0,30 mmol). ¹H NMR (400 MHz; (CD₃)₂SO, δ): 9,87 (s, 1H, N-H), 8,47 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, Ar-H), 8,03 (dd, *J* = 8,0, 1,6 Hz, 1H, Ar-H), 7,89 (dd, *J* = 7,6, 1,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,85 (ddd, *J* = 8,0, 6,8, 1,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,79 (dd, *J* = 8,4, 1,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,60 (ddd, *J* = 8,0, 6,8, 1,2 Hz), 7,58 (dd, *J* = 7,8, 1,6 Hz, 1H, Ar-H), 7,53 (d, *J* = 15,6 Hz, 1H, C=C-H), 7,52 (dd, *J* = 7,7, 1,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,38 (apptd, *J* = 7,5, 1,6 Hz, 1H, Ar-H), 7,29 (appt, *J* = 7,6 Hz, 1H, Ar-H), 7,15 (apptd, *J* = 7,4, 2,0 Hz, 1H, Ar-H), 7,13 (d, *J* = 7,7, 1,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,12 (d, *J* = 16,2 Hz, 1H, C=C-H), 2,16 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (126 MHz; (CD₃)₂SO, δ): 169,4, 159,9, 158,6, 150,8, 148,8, 141,3, 139,5, 133,6, 131,3, 130,2, 129,8, 129,5, 129,3, 128,9, 128,7, 128,2, 127,1, 126,9, 126,5, 123,54, 123,49, 114,3, 100,4, 21,2; HRMS (ESI) obliczono dla C₂₄H₁₈IN₃O₂ [M – H][–] 506,0371; znaleziono 506,0363.

(2b) 2-[(E)-2-{4-[(2,5-dimetoksyfenyl)amino]chinazolin-2-yl}etenyl]fenyl octan

Związek **2b** otrzymano w postaci jasnozielonego ciała stałego z wydajnością 41 % (45 mg), *t*_{top} 164 – 166 °C, używając 115 mg związku **1a** oraz 2,5-dimetoksyanilinę (46 mg, 0,30 mmol). ¹H NMR (400 MHz; (CD₃)₂SO, δ): 9,29 (s, 1H, N-H), 8,42 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, Ar-H), 7,94 (dd, *J* = 7,8, 1,4 Hz, 1H, Ar-H), 7,84 (ddd, *J* = 7,8, 7,0, 1,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,78 (dd, *J* = 8,3, 1,1 Hz, 1H, Ar-H), 7,74 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, C=C-H), 7,58 (ddd, *J* = 8,2, 6,8, 1,3 Hz, 1H, Ar-H), 7,53 (d, *J* = 3,1 Hz, 1H, Ar-H), 7,40 (apptd, *J* = 7,7, 1,5 Hz, 1H, Ar-H), 7,32 (appt, *J* = 7,1 Hz, 1H, Ar-H), 7,18 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, C=C-H), 7,16 (dd, *J* = 8,0, 1,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,10 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H, Ar-H), 6,83 (dd, *J* = 9,0, 3,1 Hz, 1H, Ar-H), 3,78 (s, 3H, CH₃), 3,75 (s, 3H, CH₃), 2,16 (s, 3H, COOCH₃); ¹³C NMR (126 MHz; (CD₃)₂SO, δ): 169,6, 160,0, 158,2, 153,3, 150,7, 148,9, 147,4, 133,5, 131,4, 130,2, 129,3, 128,9, 128,5, 128,2, 127,2, 126,9, 126,5, 123,6, 123,3, 114,5, 113,0, 112,4, 110,8, 56,7, 55,8, 20,7; HRMS (ESI) obliczono dla C₂₆H₂₃N₃O₄ [M – H][–] 440,1616; znaleziono 440,1615.

(3b) N-(2-chlorofenyl)-2-[(E)-2-(2-metoksyfenyl)etenyl]chinazolino-4-amina

Związek **3b** otrzymano w postaci białego ciała stałego z wydajnością 63 % (61 mg), *t*_{top} 158 – 162 °C, stosując 108 mg związku **1a** oraz 2-chloroanilinę (38 mg, 0,30 mmol). ¹H NMR (400 MHz; (CD₃)₂SO, δ): 9,76 (s, 1H, N-H), 8,47 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, Ar-H), 8,02 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H, C=C-H), 7,83 (appt, *J* = 7,6 Hz, 1H, Ar-H), 7,79 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,78 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,67 (d, *J* = 6,7 Hz, 1H, Ar-H), 7,65 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,58 (appt, *J* = 7,4 Hz, 1H, Ar-H), 7,49 (appt, *J* = 7,6 Hz, 1H, Ar-H), 7,39 (appt, *J* = 7,6 Hz, 1H, Ar-H), 7,32 (appt, *J* = 7,7 Hz, 1H, Ar-H), 7,05 (d, *J* = 15,6 Hz, 1H, C=C-H), 7,04 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, Ar-H), 6,96 (appt, *J* = 7,5 Hz, 1H, Ar-H), 3,83 (s, 3H, CH₃); HRMS (ESI) obliczono dla C₂₃H₁₈ClN₃O [M – H][–] 386,1066; znaleziono 386,1063.

(4b) 4-({2-[(E)-2-(2-metoksyfenyl)etenyl]chinazolin-4-yl}amino)fenol

Związek **4b** otrzymano w postaci żółtego ciała stałego z wydajnością 76 % (70 mg), *t*_{top} 275 – 280 °C, używając 108 mg związku **1a** oraz 4-aminofenol (109 mg, 0,30 mmol). ¹H NMR (400 MHz; (CD₃)₂SO, δ): 9,59 (s, 1H, N-H), 9,34 (s, 1H, O-H), 8,49 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, Ar-H), 8,25 (d, *J* = 16,1 Hz, 1H, C=C-H), 7,80

(appt, $J = 7,9$ Hz, 1H, Ar-H), 7,77 – 7,71 (m, 4H, Ar-H), 7,54 (appt, $J = 7,4$ Hz, 1H, Ar-H), 7,35 (appt, $J = 7,8$ Hz, 1H, Ar-H), 7,13 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H, C=C-H), 7,09 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, Ar-H), 7,00 (appt, $J = 7,5$ Hz, 1H, Ar-H), 6,86 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, Ar-H), 3,92 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (101 MHz; (CD₃)₂SO, δ): 160,7, 157,6, 154,2, 150,9, 133,2, 131,7, 131,2, 130,7, 129,1, 128,1, 127,4, 125,9, 124,8, 124,5, 123,3, 121,2, 115,2, 114,4, 112,1, 56,5; HRMS (ESI) obliczono dla C₂₃H₁₉N₃O₂ [M – H][–] 368,1405; znaleziono 368,1401.

(5b) 3-({2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]chinazolin-4-ylo}amino)fenol

Związek **5b** otrzymano w postaci żółtego ciała stałego z wydajnością 70 % (65 mg), t_{top} 293 – 296 °C, używając 108 mg związku **1a** oraz 3-aminofenol (109 mg, 0,30 mmol). ¹H NMR (400 MHz; (CD₃)₂SO, δ): 9,61 (s, 1H, N-H), 9,44 (s, 1H, O-H), 8,55 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, Ar-H), 8,29 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H, C=C-H), 7,83 (appt, $J = 7,4$ Hz, 1H, Ar-H), 7,77 (d, 7,6 Hz, 1H, Ar-H), 7,76 (d, 7,6 Hz, 1H, Ar-H), 7,56 (appt, $J = 7,1$ Hz, 1H, Ar-H), 7,53 (s, 1H, Ar-H), 7,50 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, Ar-H), 7,36 (appt, $J = 7,5$ Hz, 1H, Ar-H), 7,22 (appt, $J = 8,8$ Hz, 1H, Ar-H), 7,20 (d, $J = 16,4$ Hz, 1H, C=C-H), 7,09 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, Ar-H), 7,01 (appt, $J = 7,4$ Hz, 1H, Ar-H), 6,59 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, Ar-H), 3,91 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (101 MHz; (CD₃)₂SO, δ): 160,6, 158,0, 157,73, 157,64, 151,0, 141,0, 133,4, 132,2, 130,7, 129,36, 129,21, 128,2, 127,7, 126,0, 124,8, 123,5, 121,2, 114,5, 113,2, 112,1, 111,0, 109,6, 56,5; HRMS (ESI) obliczono dla C₂₃H₁₉N₃O₂ [M – H][–] 368,1405; znaleziono 368,1401.

(6b) N-(2H-1,3-benzodiol-5-ylo)-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]chinazolino-4-amina

Związek **6b** otrzymano w postaci kremowego ciała stałego z wydajnością 69 % (68 mg), t_{top} 238 – 239 °C, używając 108 mg związku **1a** oraz 3,4-metylenodioksyanilinę (41 mg, 0,30 mmol). ¹H NMR (400 MHz; (CD₃)₂SO, δ): 9,66 (s, 1H, N-H), 8,50 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, Ar-H), 8,26 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H, C=C-H), 7,82 (d, $J = 2$ Hz, 1H, Ar-H), 7,82 (ddd, $J = 8,6, 7,2, 0,8$ Hz, 1H, Ar-H), 7,77 (dd, $J = 7,4, 1,3$ Hz, 1H, Ar-H), 7,76 (dd, $J = 8,1, 1,6$ Hz, 1H, Ar-H), 7,56 (ddd, $J = 8,2, 6,9, 1,3$ Hz, 1H, Ar-H), 7,36 (ddd, $J = 8,4, 7,5, 1,6$ Hz, 1H, Ar-H), 7,34 (dd, $J = 8,4, 2,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,17 (d, $J = 16,1$ Hz, 1H, C=C-H), 7,09 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, Ar-H), 7,01 (appt, $J = 7,2$ Hz, 1H, Ar-H), 6,99 (d, $J = 8,4$ Hz, Ar-H), 6,09 (s, 2H, OCH₂O), 3,91 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (126 MHz; (CD₃)₂SO, δ): 160,6, 157,59, 157,52, 150,9, 147,4, 143,6, 134,2, 133,4, 131,7, 130,8, 129,0, 128,2, 127,4, 126,1, 124,7, 123,4, 121,2, 115,3, 114,4, 112,1, 108,2, 104,7, 101,5, 56,1; HRMS (ESI) obliczono dla C₂₄H₁₉N₃O₃ [M – H][–] 396,1354; znaleziono 396,1344.

(7b) N-[(2H-1,3-benzodiol-5-ylo)metylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]chinazolino-4-amina

Związek **7b** otrzymano w postaci kremowego ciała stałego z wydajnością 54 % (55 mg), t_{top} 254 – 255 °C, używając 108 mg związku **1a** oraz 3,4-(metylenodioksy)benzyloaminę (45 mg, 0,30 mmol). ¹H NMR (400 MHz; (CD₃)₂SO, δ): 8,79 (t, $J = 5,9$ Hz, 1H, Ar-NH-CH₂), 8,25 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, C=C-H), 8,22 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, Ar-H), 7,78 – 7,70 (m, 2H, Ar-H), 7,68 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 7,46 (ddd, $J = 8,2, 6,9, 1,3$ Hz, 1H, Ar-H), 7,35 (ddd, $J = 7,9, 7,5$ Hz, 1,6 Hz, 1H, Ar-H), 7,09 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, C=C-H), 7,08 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,07 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H, Ar-H), 7,03 – 6,97 (m, 2H, Ar-H), 6,86 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, Ar-H), 5,95 (s, 2H, OCH₂O), 4,73 (d, $J = 5,7$ Hz, 2H, Ar-NH-CH₂), 3,89 (s, 3H, CH₃); HRMS (ESI) obliczono dla C₂₅H₂₁N₃O₃ [M – H][–] 410,1510; znaleziono 410,1503.

(8b) 3-({2-[(E)-2-(4-metoksyfenylo)etenylo]chinazolin-4-ylo}amino)fenol

Związek **8b** otrzymano w postaci białego ciała stałego z wydajnością 69 % (64 mg), t_{top} 178 – 182 °C, używając 108 mg związku **3a** oraz 3-aminofenol (109 mg, 0,30 mmol). ¹H NMR (400 MHz; (CD₃)₂SO, δ): 9,62 (s, 1H, N-H), 9,48 (s, 1H, O-H), 8,54 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, Ar-H), 7,87 (d, $J = 15,9$ Hz, 1H, C=C-H), 7,82 (appt, $J = 7,7$ Hz, 1H, Ar-H), 7,76 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, Ar-H), 7,65 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H, Ar-H), 7,64 (d, $J = 2$ Hz, 1H, Ar-H), 7,56 (appt, $J = 7,4$ Hz, 1H, Ar-H), 7,40 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,23 (appt, $J = 8,1$ Hz, 1H, Ar-H), 7,08 (d, $J = 15,9$ Hz, 1H, C=C-H), 7,01 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, Ar-H), 6,58 (dd, $J = 8,0, 1,5$ Hz, 1H, Ar-H), 3,81 (s, 3H, CH₃); ¹³C NMR (126 MHz; (CD₃)₂SO, δ): 162,3, 158,6, 158,1, 157,0, 144,9, 138,3, 136,4, 130,9,

129,8, 128,3, 127,1, 125,0, 119,9, 117,0, 115,33, 115,21, 113,9, 113,3, 111,7, 56,0; HRMS (ESI) obliczono dla $C_{23}H_{19}N_3O_2$ $[M - H]^-$ 368,1405; znaleziono 368,1402.

(9b) 3-({2-[(E)-2-(6-bromo-2H-1,3-benzodioxol-5-yl)etenyl]}chinazolin-4-yl)amino)fenol

Związek **9b** otrzymano w postaci kremowego osadu z wydajnością 84 % (97 mg), t_{top} 249 – 257 °C, używając 131 mg związku **8a** oraz 3-aminofenol (109 mg, 0,30 mmol). 1H NMR (400 MHz; $(CD_3)_2SO$, δ): 9,62 (s, 1H, N-H), 9,39 (s, 1H, O-H), 8,56 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, Ar-H), 8,29 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, C=C-H), 7,84 (appt, $J = 7,3$ Hz, 1H, Ar-H), 7,77 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, Ar-H), 7,66 – 7,62 (m, 1H, Ar-H), 7,64 (s, 1H, Ar-H), 7,58 (appt, $J = 7,8$ Hz, 1H, Ar-H), 7,40 (s, 1H, Ar-H), 7,31 (s, 1H, Ar-H), 7,21 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, Ar-H), 7,16 (d, $J = 15,3$ Hz, 1H, C=C-H), 6,56 (d, $J = 8,32$ Hz, 1H, Ar-H), 6,14 (s, 2H, OCH_2O); ^{13}C NMR (101 MHz; $(CD_3)_2SO$, δ): 160,2, 158,0, 157,6, 150,9, 149,4, 148,4, 140,9, 135,3, 133,5, 130,2, 129,5, 129,1, 128,2, 126,2, 123,5, 116,5, 114,6, 113,3, 113,0, 111,1, 109,4, 106,8, 102,7; HRMS (ESI) obliczono dla $C_{23}H_{16}BrN_3O_3$ $[M - H]^-$ 460,0302; znaleziono 460,0296.

(10b) 3-({2-[(E)-2-(3-nitrofenyl)etenyl]}chinazolin-4-yl)amino)fenol

Związek **10b** otrzymano w postaci a yellow solid in 75% yield (72 mg), t_{top} 147 – 149 °C, using 112 mg związku **9a** oraz 3-aminofenol (109 mg, 0,30 mmol). 1H NMR (400 MHz; $(CD_3)_2SO$, δ): 9,71 (s, 1H, N-H), 9,53 (s, 1H, O-H), 8,58 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, Ar-H), 8,49 (s, 1H, Ar-H), 8,22 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H, Ar-H), 8,20 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H, Ar-H), 7,99 (d, $J = 15,9$ Hz, 1H, C=C-H), 7,87 (appt, $J = 7,5$ Hz, 1H, Ar-H), 7,81 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, Ar-H), 7,74 (appt, $J = 8,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,67 (s, 1H, Ar-H), 7,62 (appt, $J = 7,5$ Hz, 1H, Ar-H), 7,42 (d, $J = 16,0$ Hz, C=C-H), 7,38 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, Ar-H), 7,25 (appt, $J = 8,0$ Hz, 1H, Ar-H), 6,59 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, Ar-H); ^{13}C NMR (101 MHz; $(CD_3)_2SO$, δ): 159,6, 157,93, 157,79, 150,6, 148,8, 140,8, 138,2, 134,9, 133,8, 133,6, 132,2, 130,7, 129,6, 128,1, 126,6, 123,59, 123,56, 122,4, 114,6, 113,2, 111,2, 109,7; HRMS (ESI) obliczono dla $C_{22}H_{16}N_4O_3$ $[M - H]^-$ 383,1150; znaleziono 383,1144.

(11b) 4-({2-[(E)-2-(3-chlorofenyl)etenyl]}chinazolin-4-yl)amino)fenol

Związek **11b** otrzymano w postaci a light - green solid in 67% yield (62 mg), t_{top} 269 – 271 °C, using 109 mg of Związek **10a** oraz 4-aminofenol (109 mg, 0,30 mmol). 1H NMR (400 MHz; $(CD_3)_2SO$, δ): 9,63 (s, 1H, N-H), 9,32 (s, 1H, O-H), 8,50 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, Ar-H), 7,82 (appt, $J = 7,6$ Hz, 1H, Ar-H), 7,77 (d, $J = 16,4$ Hz, 1H, C=C-H), 7,76 (s, 1H, Ar-H), 7,75 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, Ar-H), 7,71 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, Ar-H), 7,65 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H, Ar-H), 7,56 (appt, $J = 7,4$ Hz, 1H, Ar-H), 7,45 (appt, $J = 7,7$ Hz, 1H, Ar-H), 7,41 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, Ar-H), 7,24 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, C=C-H), 6,88 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, Ar-H); ^{13}C NMR (101 MHz; $(CD_3)_2SO$, δ): 160,0, 157,9, 154,3, 150,7, 138,7, 135,2, 134,2, 133,3, 131,4, 131,09, 131,05, 128,9, 128,2, 127,4, 126,5, 126,2, 124,6, 123,4, 115,4, 114,5; HRMS (ESI) obliczono dla $C_{22}H_{16}ClN_3O$ $[M - H]^-$ 372,0909; znaleziono 372,0907.

(12b) 3-({2-[(E)-2-(3-chlorofenyl)etenyl]}chinazolin-4-yl)amino)fenol

Związek **12b** otrzymano w postaci żółtego ciała stałego z wydajnością 54 % (50 mg), t_{top} 234 – 236 °C, używając 109 mg związku **10a** oraz 3-aminofenol. 1H NMR (400 MHz; $(CD_3)_2SO$, δ): 9,67 (s, 1H, N-H), 9,49 (s, 1H, O-H), 8,57 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, Ar-H), 7,87 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H, C=C-H), 7,85 (appt, $J = 8,2$ Hz, 1H, Ar-H), 7,79 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,78 (s, 1H, Ar-H), 7,69 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, Ar-H), 7,64 (s, 1H, Ar-H), 7,60 (appt, $J = 7,5$ Hz, 1H, Ar-H), 7,47 (appt, $J = 7,7$ Hz, 1H, Ar-H), 7,43 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, Ar-H), 7,39 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,30 (d, $J = 15,9$ Hz, 1H, C=C-H), 7,24 (appt, $J = 8,0$ Hz, 1H, Ar-H), 6,58 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, Ar-H); ^{13}C NMR (101 MHz; $(CD_3)_2SO$, δ): 159,8, 157,92, 157,75, 150,8, 140,8, 138,7, 135,7, 134,2, 133,6, 131,11, 131,06, 129,6, 129,0, 128,2, 127,5, 126,52, 126,41, 123,5, 114,6, 113,2, 111,2, 109,6; HRMS (ESI) obliczono dla $C_{22}H_{16}ClN_3O$ $[M - H]^-$ 372,0909; znaleziono 372,0907.

(13b) N-[(2H-1,3-benzodioksol-5-ylo)metylo]-7-chloro-2-[(E)-2-(2 metoksyfenylo)etenylo]chinazolino-4-amina

¹H NMR (500 MHz; (CD₃)₂SO): δ 8,90 (t, *J* = 5,9, 1H), 8,27 (d, *J* = 16,5, 1H), 8,28 (d, *J* = 8,5, 1H), 7,74 (dd, *J* = 7,7, 1,6, 1H), 7,70 (d, *J* = 2,2, 1H), 7,50 (dd, *J* = 8,8, 2,2, 1H), 7,35 (ddd, *J* = 8,4, 7,2, 1,5, 1H), 7,10 (d, *J* = 16,0, 1H), 7,09 (dd, *J* = 8,3, 0,5, 1H), 7,06 (d, *J* = 1,5, 1H), 7,01 (d, *J* = 7,4, 1H), 6,98 (dd, *J* = 7,9, 1,7, 1H), 6,87 (d, *J* = 7,9, 1H), 5,96 (s, 2H), 4,72 (d, *J* = 5,8, 2H), 3,91 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz; (CD₃)₂SO): δ 162,0, 159,1, 157,7, 151,6, 147,7, 146,6, 137,6, 133,9, 132,5, 130,8, 129,3, 127,9, 126,6, 125,8, 125,4, 124,8, 121,5, 121,2, 113,0, 112,1, 108,8, 108,5, 101,3, 56,1, 44,1; HRMS (ESI) obliczono dla C₂₅H₂₀ClN₃O₃ [M+H]⁺ 446,1266; znaleziono 446,1264.

(14b) N-(2H-1,3-benzodioksol-5-ylo)-N-etylo-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]chinazolino-4-amina

¹H NMR (500 MHz; (CD₃)₂SO): δ 8,32 (d, *J* = 16,1 Hz, 1H), 7,77 (dd, *J* = 7,7, 1,6 Hz, 1H), 7,72 (ddd, *J* = 8,3, 1,5, 0,5 Hz, 1H), 7,61-7,59 (m, 1H), 7,36 (ddd, *J* = 8,3, 7,3, 1,6 Hz, 1H), 7,22 (d, *J* = 16,1 Hz, 1H), 7,13-7,09 (m, 2H), 7,05-7,02 (m, 2H), 7,01 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H), 6,94 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 6,70 (dd, *J* = 8,2, 2,2 Hz, 1H), 6,11 (s, 2H), 4,15 (q, *J* = 6,9 Hz, 2H), 3,90 (s, 3H), 1,31 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz; (CD₃)₂SO): δ 160,4, 160,0, 157,7, 152,6, 148,9, 146,3, 140,4, 132,5, 132,0, 130,7, 129,3, 128,5, 127,9, 126,3, 124,9, 121,3, 120,7, 115,4, 112,1, 109,3, 108,5, 102,2, 56,2, 49,1, 26,8, 11,9; HRMS (ESI) obliczono dla C₂₆H₂₃N₃O₃ [M+H]⁺ 426,1812; znaleziono 426,1810.

(15b) N-(2,2-difluoro-2H-1,3-benzodioksol-4-ylo)-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]chinazolino-4-amina

¹H NMR (500 MHz; (CD₃)₂SO): δ 10,21 (s, 1H), 8,42 (dd, *J* = 8,3, 0,8 Hz, 1H), 8,03 (d, *J* = 16,1 Hz, 1H), 7,87 (ddd, *J* = 8,3, 6,9, 1,3 Hz, 1H), 7,81 (dd, *J* = 8,4, 0,9 Hz, 1H), 7,66 (dd, *J* = 7,7, 1,6 Hz, 1H), 7,61 (ddd, *J* = 8,2, 6,8, 1,3 Hz, 1H), 7,37 (dd, *J* = 7,3, 2,0 Hz, 1H), 7,34-7,29 (m, 3H), 7,13 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 7,04 (dd, *J* = 8,3, 0,5 Hz, 1H), 6,97 (appt, *J* = 7,4 Hz, 1H), 3,82 (s, 3H); HRMS (ESI) obliczono dla C₂₄H₁₇F₂N₃O₃ [M+H]⁺ 434,1311; znaleziono 434,1307.

(16b) 5-{2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]chinazolin-4-ylo}amino)-2,3-dihydro-1H-1,3-benzodiazol-2-on

¹H NMR (500 MHz; (CD₃)₂SO): δ 10,69 (br s, 2H), 9,69 (s, 1H), 8,50 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H), 8,20 (d, *J* = 16,1 Hz, 1H), 7,80 (ddd, *J* = 8,2, 6,9, 1,2 Hz, 1H), 7,75 (dd, *J* = 6,9, 1,4 Hz, 1H), 7,74 (dd, *J* = 7,7, 1,6 Hz, 1H), 7,58 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 7,54 (ddd, *J* = 8,2, 6,9, 1,4 Hz, 1H), 7,51 (dd, *J* = 8,4, 2,0 Hz, 1H), 7,34 (ddd, *J* = 8,4, 7,1, 1,5 Hz, 1H), 7,16 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 7,08 (dd, *J* = 8,3, 0,6 Hz, 1H), 7,01 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 7,00 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 3,87 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz; (CD₃)₂SO): δ 160,7, 157,76, 157,68, 156,1, 150,9, 133,3, 133,0, 132,1, 130,7, 130,1, 129,3, 128,1, 127,8, 126,7, 125,9, 124,8, 123,4, 121,2, 115,9, 114,4, 112,1, 108,3, 104,6, 56,0; HRMS (ESI) obliczono dla C₂₄H₁₉N₅O₂ [M+H]⁺ 410,1612; znaleziono 410,1608.

4-Sulfanylochinazoliny

Związki **1c** – **14c** otrzymano stosując prekursor 4-metylobenzenosulfonowy (związki serii a) oraz 1,2 ekwiwalentu molowego aryliotolu w obecności równomolowej ilości NEt(*i*Pr)₂ w 2-propanolu, zachowując stężenie 0,1 M, ogrzewając w temperaturze 80 °C do momentu zużycia substratu (TLC). Reakcję prowadzono w zamkniętej fiolce. Po zakończonej reakcji pozostawiano do ochłodzenia. Produkty krystalizowały z mieszaniny poreakcyjnej. Sączone na lejku pod zmniejszonym ciśnieniem, przemywając 2-propanolem.

(1c) 4-[(2-chlorofenilo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenilo)etenilo]chinazolina

¹H NMR (500 MHz; (CD₃)₂SO): δ 8,21 (ddd, *J* = 8,2, 1,3, 0,6 Hz, 1H), 7,99 (ddd, *J* = 8,4, 7,0, 1,4 Hz, 1H), 7,93 (ddd, *J* = 8,4, 1,2, 0,6 Hz, 1H), 7,89 (dd, *J* = 7,7, 1,6 Hz, 1H), 7,82 (dd, *J* = 8,1, 1,3 Hz, 1H), 7,74-7,69 (m, 3H), 7,60 (dd, *J* = 7,9, 1,5 Hz, 1H), 7,58 (apptd, *J* = 7,6, 1,4 Hz, 1H), 7,34 (ddd, *J* = 8,5, 7,1, 1,5 Hz, 1H), 7,13 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 7,05 (dd, *J* = 8,4, 0,7 Hz, 1H), 6,97 (appt, *J* = 7,4 Hz, 1H), 3,86 (s, 3H);

(2c) 4-[(2-chlorofenilo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2,4-dimetoksyfenilo)etenilo]chinazolina

¹H NMR (500 MHz; (CD₃)₂SO): δ 8,19 (dd, *J* = 8,2, 0,8 Hz, 1H), 7,97 (ddd, *J* = 8,4, 7,0, 1,4 Hz, 1H), 7,90 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,88 (m, 1H), 7,88 (dd, *J* = 7,6, 1,6 Hz, 1H), 7,81 (dd, *J* = 8,1, 1,3 Hz, 1H), 7,72 (apptd, *J* = 7,8, 1,6 Hz, 1H), 7,69 (ddd, *J* = 8,2, 7,0, 1,2 Hz, 1H), 7,61 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 7,57 (apptd, *J* = 7,6, 1,3 Hz, 1H), 7,52 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,00 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 6,58 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H), 6,56 (dd, *J* = 8,4, 2,4 Hz, 1H), 3,85 (s, 3H), 3,80 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz; (CD₃)₂SO): δ 168,3, 162,2, 160,0, 159,2, 149,4, 139,5, 139,0, 135,1, 134,1, 132,5, 130,7, 129,2, 128,6, 128,6, 127,8, 126,6, 124,9, 124,1, 121,1, 117,3, 106,5, 98,8, 56,1, 55,8; HRMS (ESI) obliczono dla C₂₄H₁₉ClN₂O₂S [M+H]⁺ 435,0929; znaleziono 435,0929;

(3c) 4-[(2-bromofenilo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenilo)etenilo]chinazolina

¹H NMR (500 MHz; (CD₃)₂SO): δ 8,21 (ddd, *J* = 8,4, 1,5, 0,5 Hz, 1H), 7,99 (ddd, 8,5, 7,2, 1,5 Hz, 1H), 7,97 (m, 1H), 7,94 (ddd, *J* = 8,4, 1,5, 0,5 Hz, 1H), 7,92 (m, 1H), 7,90 (m, 1H), 7,72 (ddd, *J* = 8,5, 7,2, 1,5 Hz, 1H), 7,71 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 7,64-7,61 (m, 2H), 7,60 (dd, *J* = 7,5, 1,9 Hz, 1H), 7,34 (ddd, *J* = 8,4, 7,2, 1,6 Hz, 1H), 7,13 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 7,05 (dd, *J* = 8,4, 1,0 Hz, 1H), 6,97 (apptd, *J* = 7,5, 0,7 Hz, 1H), 3,86 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz; (CD₃)₂SO): δ 168,6, 159,6, 157,8, 149,3, 139,0, 135,2, 134,0, 134,0, 132,5, 131,20, 131,04, 129,2, 128,7, 128,5, 128,09, 127,90, 127,5, 126,0, 124,30, 124,10, 121,27, 121,17, 112,1, 56,0; HRMS (ESI) obliczono dla C₂₄H₁₇BrN₂O₃S [M+H]⁺ 493,0216; znaleziono 493,0219.

(4c) 7-chloro-4-[(2-chlorofenilo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenilo)etenilo]chinazolina

¹H NMR (500 MHz; (CD₃)₂SO): δ 8,24 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 8,00 (d, *J* = 1,8 Hz, 1H), 7,89 (dd, *J* = 7,6 Hz, 1,5, 1H), 7,82 (dd, *J* = 8,1, 1,2 Hz, 1H), 7,77-7,67 (m, 3H), 7,64-7,55 (m, 2H), 7,37-7,33 (m, 1H), 7,12 (d, *J* = 15,9 Hz, 1H), 7,05 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 6,97 (appt, *J* = 7,4 Hz, 1H), 3,86 (s, 3H); HRMS (ESI) obliczono dla C₂₃H₁₆Cl₂N₂O₃S [M+H]⁺ 439,0433; znaleziono 439,0439.

(6c) 4-[(6-bromo-2H-1,3-benzodioksol-5-yl)sulfanylo]-7-chloro-2-[(E)-2-(2-metoksyfenilo)etenilo]chinazolina

¹H NMR (500 MHz; (CD₃)₂SO): δ 8,19 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 7,97 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 7,89 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 7,69 (dd, *J* = 8,8, 2,1 Hz, 1H), 7,63 (dd, *J* = 7,7, 1,6 Hz, 1H), 7,55 (s, 1H), 7,42 (s, 1H), 7,36 (ddd, *J* = 8,4, 7,2, 1,4 Hz, 1H), 7,14 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 7,08 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,00 (appt, *J* = 7,5 Hz, 1H), 6,21 (s, 2H), 3,89 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz; (CD₃)₂SO): δ 169,3, 160,8, 158,1, 150,7, 150,3, 148,2, 139,6, 135,0, 131,3, 128,3, 128,1, 127,54, 127,52, 126,0, 124,6, 123,1, 121,3, 120,00, 119,99, 117,4, 113,8, 112,4, 103,3, 56,2; HRMS (ESI) obliczono dla C₂₄H₁₆BrClN₂O₃S [M+H]⁺ 526,9826; znaleziono 526,9834.

(7c) 2-[(E)-2-(2-metoksyfenilo)etenilo]-4-[(3-metoksyfenilo)sulfanylo]chinazolina

¹H NMR (500 MHz; (CD₃)₂SO): δ 8,18 (ddd, *J* = 8,3, 1,3, 0,6 Hz, 1H), 7,98 (ddd, *J* = 8,4, 6,9, 1,4 Hz, 1H), 7,92 (ddd, *J* = 8,3, 1,3, 0,6 Hz, 1H), 7,89 (d, *J* = 16,1 Hz, 1H), 7,70 (ddd, *J* = 8,2, 6,9, 1,3 Hz, 1H), 7,62 (dd, *J* = 7,7, 1,6 Hz, 1H), 7,52 (appt, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,36-7,30 (m, 3H), 7,22 (ddd, *J* = 8,4, 2,6, 0,9 Hz, 1H), 7,17 (d, *J* = 16,1 Hz, 1H), 7,06 (dd, *J* = 8,3, 0,6 Hz, 1H), 6,98 (appt, 1H), 3,85 (s, 3H), 3,81 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz; (CD₃)₂SO): δ 169,8, 160,1, 159,6, 157,8, 149,2, 135,1, 134,0, 131,2, 130,6, 128,7, 128,15, 128,15, 127,98, 127,98, 127,7, 124,3, 124,0, 121,29, 121,15, 120,7, 116,6, 112,1, 55,88, 55,82; HRMS (ESI) obliczono dla C₂₄H₂₀N₂O₂S [M+H]⁺ 401,1318; znaleziono 401,1318.

(8c) 7-chloro-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]-4-[(3-metoksyfenylo)sulfanylo]chinazolina

¹H NMR (500 MHz; (CD₃)₂SO): δ 8,21 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 7,99 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 7,90 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 7,71 (dd, *J* = 8,8, 2,1 Hz, 1H), 7,63 (dd, *J* = 7,7, 1,5 Hz, 1H), 7,52 (appt, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,36 (ddd, *J* = 8,4, 7,2, 1,4 Hz, 1H), 7,33-7,30 (m, 2H), 7,23 (ddd, *J* = 8,4, 2,6, 0,8 Hz, 1H), 7,16 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 7,06 (dd, *J* = 8,4, 0,8 Hz, 1H), 6,98 (appt, *J* = 7,5 Hz, 1H), 3,86 (s, 3H), 3,81 (s, 3H); HRMS obliczono dla C₂₄H₁₉ClN₂O₂S [M+H]⁺: 435,0928; znaleziono 435,0936.

(9c) 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]-4-[(4-(metylosulfanylo)fenylo)sulfanylo]chinazolina

¹H NMR (500 MHz; (CD₃)₂SO): δ 8,19 (ddd, *J* = 8,3, 1,3, 0,6 Hz, 1H), 7,98 (ddd, *J* = 8,4, 6,9, 1,4 Hz, 1H), 7,92 (d, *J* = 8,3, 1,3, 0,6 Hz, 1H), 7,85 (d, *J* = 16,1 Hz, 1H), 7,70 (ddd, *J* = 8,2, 6,9, 1,3 Hz, 1H), 7,65 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,60 (dd, *J* = 7,7, 1,7 Hz, 1H), 7,48 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,35 (ddd, *J* = 8,4, 7,2, 1,6 Hz, 1H), 7,16 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 7,06 (dd, *J* = 8,4, 1,0 Hz, 1H), 6,98 (appt, *J* = 7,4 Hz, 1H), 3,88 (s, 3H), 2,57 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz; (CD₃)₂SO): δ 170,1, 159,6, 157,9, 149,1, 141,4, 136,7, 136,7, 135,1, 134,2, 131,2, 128,7, 128,2, 128,00, 127,84, 126,6, 126,6, 124,4, 124,0, 122,5, 121,26, 121,16, 112,1, 56,0, 14,8; HRMS obliczono dla C₂₄H₂₀N₂O₅S₂ [M+H]⁺ 417,1090; znaleziono 417,1092.

(10c) 4-(2*H*-1,3-benzodioksol-5-ylo-sulfanylo)-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]chinazolina

¹H NMR (500 MHz; (CD₃)₂SO): δ 8,15 (ddd, *J* = 8,2, 1,3, 0,6 Hz, 1H), 7,97 (ddd, *J* = 8,4, 6,9, 1,4 Hz, 1H), 7,91 (ddd, *J* = 8,5, 1,3, 0,5 Hz, 1H), 7,90 (d, 16,0 Hz, 1H), 7,68 (ddd, *J* = 8,2, 6,9, 1,3 Hz, 1H), 7,65 (dd, *J* = 7,7, 1,5 Hz, 1H), 7,35 (ddd, *J* = 8,3, 7,3, 1,6 Hz, 1H), 7,27 (d, *J* = 1,7 Hz, 1H), 7,23 (dd, *J* = 8,0, 1,8 Hz, 1H), 7,16 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,15 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 7,06 (dd, *J* = 8,4, 0,5 Hz, 1H), 6,99 (appt, *J* = 7,5 Hz, 1H), 6,16 (s, 2H), 3,86 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz; (CD₃)₂SO): δ 170,6, 159,6, 157,8, 149,4, 149,1, 148,4, 135,0, 133,9, 131,13, 131,02, 128,7, 127,91, 127,87, 127,74, 124,4, 124,0, 121,22, 121,19, 118,7, 116,3, 112,1, 109,6, 102,2, 55,9; HRMS obliczono dla C₂₄H₁₈N₂O₃S [M+H]⁺ 415,1111; znaleziono 415,1110.

(11c) 4-[(2,5-dichlorofenylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]chinazolina

¹H NMR (500 MHz; (CD₃)₂SO): δ 8,20 (ddd, *J* = 8,2, 1,1, 0,6 Hz, 1H), 8,02-7,98 (m, 2H), 7,95 (ddd, *J* = 8,2, 1,1, 0,6 Hz, 1H), 7,82 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,78 (dd, *J* = 8,5, 2,5 Hz, 1H), 7,76 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 7,72 (ddd, *J* = 8,2, 6,8, 1,4 Hz, 1H), 7,60 (dd, *J* = 7,7, 1,7 Hz, 1H), 7,35 (ddd, *J* = 8,4, 7,2, 1,6 Hz, 1H), 7,15 (d, *J* = 16,1 Hz, 1H), 7,07 (dd, *J* = 8,3, 0,9 Hz, 1H), 7,00-6,97 (m, 1H), 3,88 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz; (CD₃)₂SO): δ 168,0, 159,7, 158,0, 149,5, 138,2, 137,8, 135,2, 134,0, 132,5, 132,12, 131,98, 131,1, 129,0, 128,8, 128,10, 128,01, 127,8, 124,6, 124,1, 121,37, 121,22, 112,3, 56,1; HRMS (ESI) obliczono dla C₂₃H₁₆Cl₂N₂O₂S [M+H]⁺ 439,0433; znaleziono 439,0439.

(12c) 2-fluoroetylo 2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]chinazolin-4-ylo)sulfanylo)benzoesan

¹H NMR (500 MHz; (CD₃)₂SO): δ 8,19 (ddd, *J* = 8,3, 1,4, 0,6 Hz, 1H), 8,11-8,09 (m, 1H), 7,97 (ddd, *J* = 8,4, 6,9, 1,4 Hz, 1H), 7,91 (ddd, *J* = 8,3, 1,4, 0,6 Hz, 1H), 7,89-7,87 (m, 1H), 7,82-7,78 (m, 3H), 7,69 (ddd, *J* = 8,2, 6,9, 1,3 Hz, 1H), 7,61 (dd, *J* = 7,7, 1,7 Hz, 1H), 7,34 (ddd, *J* = 8,5, 7,1, 1,5 Hz, 1H), 7,12 (d, *J* = 16,1 Hz, 1H), 7,06 (dd, *J* = 8,4, 0,9 Hz, 1H), 6,98 (appt, *J* = 7,4 Hz, 1H), 4,45 (m, *J* = 48 Hz, 2H), 4,27 (m, *J* = 30 Hz, 2H), 3,87 (s, 3H); ¹³C NMR (126 MHz; (CD₃)₂SO): δ 169,3, 166,1, 159,5, 157,8, 149,2, 137,8, 135,6, 135,1, 134,0, 132,9, 131,1, 131,09, 130,3, 128,7, 128,01, 127,92, 127,56, 127,48, 124,4, 124,1, 121,29, 121,13, 112,1, 81,70 (d, *J* = 167,3, 1H), 64,66 (d, *J* = 18,9, 1H), 64,58, 55,9; HRMS (ESI) obliczono dla C₂₆H₂₁FN₂O₃S [M+H]⁺ 461,1330; znaleziono 461,1327.

(13c) 4-[(6-bromo-2*H*-1,3-benzodioksol-5-ylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2-metoksyfenylo)etenylo]chinazolina

¹H NMR (500 MHz; (CD₃)₂SO): δ 8,17 (dd, *J* = 8,2, 1,1 Hz, 1H), 7,98 (ddd, *J* = 8,4, 6,9, 1,4 Hz, 1H), 7,93 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 7,86 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 7,70 (ddd, *J* = 8,2, 6,9, 1,3 Hz, 1H), 7,66 (dd, *J* = 7,7, 1,6 Hz, 1H), 7,61 (s, 1H), 7,46 (s, 1H), 7,36 (ddd, *J* = 8,5, 7,2, 1,5 Hz, 1H), 7,16 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 7,07 (dd, *J* = 8,5,

1,0 Hz, 1H), 6,99 (appt, $J = 7,4$ Hz, 1H), 6,22 (s, 2H), 3,87 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 169,0, 159,6, 157,8, 150,6, 149,2, 148,1, 135,1, 133,9, 131,2, 128,7, 128,0, 127,78, 127,62, 124,4, 124,0, 123,3, 121,23, 121,22, 120,0, 117,5, 113,8, 112,1, 103,3, 56,0; HRMS (ESI) obliczono dla $\text{C}_{24}\text{H}_{17}\text{BrN}_2\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 493,0216; znaleziono 493,0219.

(14c) 4-[(6-bromo-2H-1,3-benzodioxol-5-ylo)sulfanylo]-2-[(E)-2-(2,4-dimetoksyfenylo)etenylo]chinazolina

^1H NMR (500 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 8,15 (m, 1H), 7,96 (ddd, $J = 8,4, 7,0, 1,4$ Hz, 1H), 7,89 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,77 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H), 7,67 (ddd, $J = 8,2, 6,9, 1,2$ Hz, 1H), 7,60 (s, 1H), 7,58 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H), 7,45 (s, 1H), 7,03 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H), 6,60 (s, 1H), 6,59 (dd, $J = 9,5, 2,5$ Hz, 1H), 6,22 (s, 2H), 3,87 (s, 3H), 3,81 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 168,8, 162,2, 160,1, 159,2, 150,6, 149,4, 148,1, 135,1, 134,0, 129,2, 128,6, 127,7, 125,1, 124,0, 123,3, 121,1, 120,1, 117,5, 113,8, 106,5, 103,3, 98,9, 56,1, 55,9; HRMS (ESI) obliczono dla $\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{BrClN}_2\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 523,0322; znaleziono 523,0333.

Kwasy sulfonowe

1,3-(benzodioxol-5-ylo)-sulfonian sodu

Związek otrzymano stosując metodologię opisaną w dokumencie patentowym EP1219614 [204]. Do roztworu 1,3-Benzodioxolu (10 mmol, 1220 mg) w 10 mL EtOAc, dodano Ac_2O (30 mmol; 3000 mg) i wkraplano H_2SO_4 (11 mmol; 1100 mg) w temperaturze łaźni lodowej. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na 3 h do mieszania w temperaturze pokojowej. Do mieszaniny reakcyjnej dodawano roztwór NaOAc (11 mmol; 902 mg) w EtOH (5 mL). W czasie dodawania roztworu mieszaninę reakcyjną chłodzono na łaźni lodowej. Obserwuje się wydzielanie białego osadu, który sączono na lejku pod zmniejszonym ciśnieniem i przemywano EtOH, uzyskując 2221 mg białego osadu z wydajnością 99 %; ^1H NMR (500 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 7,13 (dd, $J = 8,0, 1,6$ Hz, 1H), 7,04 (d, $J = 1,5$ Hz, 1H), 6,83 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 6,01 (s, 2H).

Kwas 6-bromobenzo[d][1,3]dioxolo-5-sulfonowy

W temperaturze 0 °C, do roztworu 5-bromo-2H-1,3-benzodioxolu (2010 mg; 10 mmol) w CH_2Cl_2 (40 mL), dodawano kroplami roztwór HSO_3Cl (1398 mg; 12 mmol) w 5 mL CH_2Cl_2 . Mieszanie kontynuowano przez 5 minut i sączono na lejku pod zmniejszonym ciśnieniem. Osad przemywano 3 x 10 mL CH_2Cl_2 , otrzymując 2380 mg jasno-szarego osadu z wydajnością 85 %; t_{top} : 87-88 °C; ^1H NMR (500 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 7,38 (s, 1H), 7,13 (s, 1H), 6,06 (s, 2H).

Chlorki kwasów sulfonowych

Do roztworu prekursora benzenosulfonianowego (2 mmol) w 10 mL CH_2Cl_2 dodano SOCl_2 (1666 mg; 14 mmol) oraz 0,2 mL DMF. Całość ogrzewano przez 16 h, w temperaturze 40 °C. Po ochłodzeniu, mieszaninę reakcyjną filtrowano przez złożę krzemionki, przepłukując CH_2Cl_2 (25 mL). Rozpuszczalnik usunięto na wyparce pod zmniejszonym ciśnieniem, dodano 15 mL heksanu i pozostawiono do krystalizacji w lodówce.

Chlorek (1,3-benzodioxolo)-5-sulfonylu

Związek otrzymano w postaci białych kryształów, z wydajnością 74 %, stosując 1,3-(benzodioxol-5-ylo)-sulfonian sodu (2 mmol; 404 mg); ^1H NMR (500 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 7,14 (dd, $J = 8,0, 1,7$ Hz, 1H), 7,04 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H), 6,84 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 6,02 (s, 2H).

Chlorek 6-bromobenzo[d][1,3]dioksolo-5-sulfonylu

Związek otrzymano w postaci białych kryształów z wydajnością 65 %, stosując kwas 6-bromobenzo[d][1,3]dioksolo-5-sulfonowego (562 mg, 2 mmol); t_{top} : 55 – 56 °C.; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7,62 (s, 1H), 7,23 (s, 1H), 6,17 (s, 2H).

Arylotiole

Związki otrzymano według zmodyfikowanego przepisu preparatywnego [206]. Do roztworu chlorku arylosulfonowego (1 mmol) w bezwodnym toluenie (10 mL), w zamkniętej fiole z septą, w atmosferze argonu, wkraplano roztwór trifenylofosfiny (786 mg; 3 mmol) w toluenie (1 mL). Reakcja jest egzotermiczna. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono do mieszania przez 15 minut a następnie dodano 5 mL wody, kontynuując mieszanie przez 10 minut. Wodną warstwę odrzucono, a warstwę organiczną ekstrahowano 10 % roztworem NaOH (2 x 15 mL) i przemyto toluenem (2 x 10 mL). Zalkalizowaną wodną warstwę zneutralizowano rozcieńczonym roztworem HCl a następnie ekstrahowano toluenem (2 x 25 mL). Warstwę organiczną suszono and bezwodnym MgSO_4 . Rozpuszczalnik odparowano na wyparce pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując opisane poniżej arylotiole.

2H-1,3-benzodioksol-5-tiol

Związek otrzymano w postaci bezbarwnego oleju z wydajnością 45 % (68 mg), stosując chlorek (1,3-benzodioksolo)-5-sulfonylu (220 mg; 1 mmol). Produkt zużyto bezzwłocznie do kolejnej reakcji; ^1H NMR (500 MHz; CDCl_3) δ 6,84-6,78 (m, 2H), 6,69 (d, J = 8,5 Hz, 1 H), 5,93 (s, 2H), 3,42 (s, 1H).

6-bromo-2H-1,3-benzodioksol-5-tiol

Związek otrzymano w postaci jasno żółtego oleju, z wydajnością 38 % (89 mg), stosując chlorek 6-bromobenzo[d][1,3]dioksolo-5-sulfonylu (300 mg; 1 mmol); ^1H NMR (500 MHz; CDCl_3): δ 7,03 (s, 1H), 6,88 (s, 1H), 5,98 (s, 2H), 3,87 (s, 1H).

Pozostałe reagenty

5-bromo-2H-1,3-benzodioksol

Do roztworu 1,3-benzodioksolu (12,2 g; 100 mmol) w acetonitrylu (100 mL), dodawano porcjami NBS (17,8 g; 0,1 mol). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 h. Acetonitryl usunięto na wyparce pod zmniejszonym ciśnieniem a pozostałość rozpuszczono w CH_2Cl_2 i przemywano roztworem wodorotlenku sodu. Warstwę organiczną suszono nad bezwodnym MgSO_4 ; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 6,96 – 6,92 (m, 2H), 6,68 (dd, J = 7,8, 0,6 Hz, 1H), 5,96 (s, 2H).

2-fluoroetylo 2-sulfanylobenzoesan

Związek otrzymano stosując kwas tiosalicylowy (3 mmol; 462 mg) oraz 2-fluoroetanol (21 mmol, 1344 mg) w obecności 0,1 mL kwasu siarkowego (98 %). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w polu mikrofalowym (100 °C, MW: 80 W, 1 h). Po reakcji rozdzielano (heksan – EtOAc 6:3) stosując kartridż z żelazem krzemionkowym flash (40 g), otrzymując bezbarwny olej z wydajnością 35 %; ^1H NMR (500 MHz; CDCl_3): δ 8,09 (dd, 7,7, 1,5 Hz, 1H), 7,36-7,34 (m, 2H), 7,19 (ddd, J = 8,1, 6,2, 2,0 Hz, 1H), 4,76 (m, J = 47,4 Hz, 2H), 4,64 (s, 1H), 4,59 (m, J = 28,5 Hz, 2H).

Cytowania

- [1] O. Fedorov, S. Müller, S. Knapp, The (un)targeted cancer kinome, *Nat. Chem. Biol.* 6 (2010) 166–169. doi:10.1038/nchembio.297.
- [2] S. Faivre, S. Djelloul, E. Raymond, New Paradigms in Anticancer Therapy: Targeting Multiple Signaling Pathways With Kinase Inhibitors, *Semin. Oncol.* 33 (2006) 407–420. doi:10.1053/j.seminoncol.2006.04.005.
- [3] I. Gathmann, M. Sc, M. Baccarani, F. Cervantes, J.J. Cornelissen, T. Fischer, A. Hochhaus, T. Hughes, K. Lechner, J.L. Nielsen, P. Rousselot, J. Reiffers, G. Saglio, J. Shepherd, B. Simonsson, A. Gratwohl, J.M. Goldman, H. Kantarjian, K. Taylor, G. Verhoef, A.E. Bolton, B.N. Sc, R. Capdeville, B.J. Druker, I. Investigators, Imatinib Compared with Interferon and Low-Dose Cytarabine for Newly Diagnosed Chronic-Phase Myeloid Leukemia, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 994–1004. doi:10.1056/NEJMoa022457.
- [4] A. Mrozek-Wilczkiewicz, D.S. Kalinowski, R. Musiol, J. Finster, A. Szurko, K. Serafin, M. Knas, S.K. Kamalapuram, Z. Kovacevic, J. Jampilek, A. Ratuszna, J. Rzeszowska-Wolny, D.R. Richardson, J. Polanski, Investigating the anti-proliferative activity of styrylzanaphthalenes and azanaphthalenediones., *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 2664–71. doi:10.1016/j.bmc.2010.02.025.
- [5] B.A. Foster, H.A. Coffey, M.J. Morin, Pharmacological Rescue of Mutant p53 Conformation and Function, *Science* (80-.). 286 (1999) 2507–2510. doi:10.1126/science.286.5449.2507.
- [6] F. Baska, Styrylquinazoline derivatives as pharmaceutically active agents, WO2015019121A1, 2015.
- [7] D. Zhou, M.Z. Springer, D. Xu, D. Liu, A. Hudmon, K.F. Macleod, S.O. Meroueh, Small molecules inhibit STAT3 activation, autophagy, and cancer cell anchorage-independent growth, *Bioorg. Med. Chem.* 25 (2017) 2995–3005. doi:10.1016/j.bmc.2017.03.048.
- [8] D. Xu, L. Li, D. Zhou, D. Liu, A. Hudmon, S.O. Meroueh, Structure-Based Target-Specific Screening Leads to Small-Molecule CaMKII Inhibitors, *ChemMedChem.* 12 (2017) 660–677. doi:10.1002/cmdc.201600636.
- [9] L. Okano, Masahiko; Nippon Shinyaku Co., Quinazoline derivatives and drugs, EP1340748A1, 2003.
- [10] T. Zhou, L. Commodore, Y. Wang, T.K. Sawyer, W.C. Shakespeare, T. Clackson, X. Zhu, D.C. Dalgarno, Structural Analysis of DFG-in and DFG-out Dual Src-Abl Inhibitors Sharing a Common Vinyl Purine Template, *Chem Biol Drug Des.* 75 (2010) 18–28. doi:10.1111/j.1747-0285.2009.00905.x.
- [11] W. Huang, X. Zhu, Y. Wang, M. Azam, D. Wen, R. Sundaramoorthi, R.M. Thomas, S. Liu, G. Banda, S.P. Lentini, S. Das, Q. Xu, J. Keats, F. Wang, S. Wardwell, Y. Ning, J.T. Snodgrass, M.I. Broudy, K. Russian, G.Q. Daley, J. Iulucci, D.C. Dalgarno, T. Clackson, T.K. Sawyer, W.C. Shakespeare, 9-(Arenethenyl)purines as Dual Src /Abl Kinase Inhibitors Targeting the Inactive Conformation: Design, Synthesis, and Biological Evaluation, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 4743–4756. doi:10.1021/jm900166t.
- [12] Y. Wang, W.C. Shakespeare, W. Huang, R. Sundaramoorthi, S. Lentini, S. Das, S. Liu, G. Banda, D. Wen, X. Zhu, Q. Xu, J. Keats, F. Wang, S. Wardwell, Y. Ning, J.T. Snodgrass, M.I. Broudy, K. Russian, D. Dalgarno, T. Clackson, T.K. Sawyer, Novel N9-arenethenyl purines as potent dual Src/Abl tyrosine kinase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18 (2008) 4907–4912. doi:10.1016/j.bmcl.2008.06.042.
- [13] L. Shewchuk, A. Hassell, B. Wisely, W. Rocque, W. Holmes, J. Veal, L.F. Kuyper, Binding mode of the 4-anilinoquinazoline class of protein kinase inhibitor: X-ray crystallographic studies of 4-anilinoquinazolines bound to cyclin-dependent kinase 2 and p38 kinase, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 133–138. doi:10.1021/jm990401t.
- [14] T. Hunter, A thousand and one protein kinases, *Cell.* 50 (1987) 823–829. doi:10.1016/0092-8674(87)90509-5.
- [15] V. Alagarsamy, K. Chitra, G. Saravanan, V.R. Solomon, M.T. Sulthana, B. Narendhar, An overview of quinazolines: Pharmacological significance and recent developments, *Eur. J. Med. Chem.* 151 (2018) 628–685. doi:10.1016/j.ejmech.2018.03.076.
- [16] G. Marzaro, A. Guiotto, A. Chilin, Quinazoline derivatives as potential anticancer agents: a patent review (2007 - 2010)., *Expert Opin. Ther. Pat.* 22 (2012) 223–252. doi:10.1517/13543776.2012.665876.
- [17] J. Polanski, A. Kurczyk, A. Bak, R. Musiol, Privileged structures - dream or reality: preferential organization of azanaphthalene scaffold., *Curr. Med. Chem.* 19 (2012) 1921–45.
- [18] F. Bonachera, D. Horvath, Fuzzy Tricentric Pharmacophore Fingerprints . 1. Topological Fuzzy Pharmacophore Triplets and Adapted Molecular Similarity Scoring Schemes, *J. Chem. Inf. Model.* 46 (2006) 2457–2477. doi:10.1021/ci6002416.
- [19] O. Hantschel, G. Superti-Furga, Cell biology: A key driver of therapeutic innovation, *J. Cell Biol.* 199 (2012) 571–575. doi:10.1083/jcb.201208111.
- [20] D.F. Veber, S.R. Johnson, H.Y. Cheng, B.R. Smith, K.W. Ward, K.D. Kopple, Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 2615–2623. doi:10.1021/jm020017n.
- [21] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.*

- 23 (1997) 3–25. doi:10.1016/S0169-409X(96)00423-1.
- [22] P.W. Snyder, J. Mecnovic, D.T. Moustakas, S.W. Thomas, M. Harder, E.T. Mack, M.R. Lockett, A. Heroux, W. Sherman, G.M. Whitesides, Mechanism of the hydrophobic effect in the biomolecular recognition of arylsulfonamides by carbonic anhydrase, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (2011) 17889–17894. doi:10.1073/pnas.1114107108.
- [23] T. Kalliokoski, Price-Focused Analysis of Commercially Available Building Blocks for Combinatorial Library Synthesis, *ACS Comb. Sci.* 17 (2015) 600–607. doi:10.1021/acscombsci.5b00063.
- [24] S.Y. Chow, A. Nelson, Embarking on a Chemical Space Odyssey, *J. Med. Chem.* 60 (2017) 3591–3593. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b00423.
- [25] J. Mularski, B. Czaplińska, W. Cieřlik, J. Bełłot, P. Bartczak, R. Sitko, J. Polański, R. Musiol, Electrolytic copper as cheap and effective catalyst for one-pot triazole synthesis, *Sci. Rep.* 8 (2018) 4496. doi:10.1038/s41598-018-22703-0.
- [26] S. Cha, H. Kim, Tight binding inhibitors—IX: Kinetic parameters of dihydrofolate reductase inhibited by methotrexate, an example of equilibrium study, *Biochem. Pharmacol.* 30 (1981) 1507–1515. doi:10.1016/0006-2952(81)90374-9.
- [27] P.T.R. Rajagopalan, Z. Zhang, L. Mccourt, M. Dwyer, S.J. Benkovic, G.G. Hammes, J. Gttctgc-, J. Acctgcc-, Interaction of dihydrofolate reductase with methotrexate: Ensemble and single-molecule kinetics, *PNAS.* 99 (2002) 13481–13486. doi:10.1073/pnas.172501499.
- [28] W.P. Walters, J. Green, J.R. Weiss, M.A. Murcko, What do medicinal chemists actually make? A 50-year retrospective, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 6405–6416. doi:10.1021/jm200504p.
- [29] L. Xing, Discovery of Atropisomer PH-797804 as a Potent, Selective and Efficacious P38 MAP Kinase Inhibitor as Clinical Candidate, *JSM Chem.* 2 (2014) 1–3.
- [30] B. EVARTS, Jerry, Atropoisomers of PI3K-inhibiting compounds, WO 2012040634A1, 2012.
- [31] O. Williams, B.T. Houseman, E.J. Kunkel, B. Aizenstein, R. Hoffman, Z.A. Knight, K.M. Shokat, Article Discovery of Dual Inhibitors of the Immune Cell PI3Ks p110 d and p110 g : a Prototype for New Anti-inflammatory Drugs, *Chem. Biol.* 17 (2010) 123–134. doi:10.1016/j.chembiol.2010.01.010.
- [32] J. Tan, T. Ou, J. Hou, Y. Lu, S. Huang, H. Luo, J. Wu, Isaindigotone Derivatives: A New Class of Highly Selective Ligands for Telomeric G-Quadruplex DNA, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 2825–2835. doi:10.1021/jm801600m.
- [33] J. Liu, C.J. Wilson, P. Ye, K. Sprague, K. Sargent, Y. Si, G. Beletsky, D. Yohannes, S. Ng, Privileged structure-based quinazolinone natural product-templated libraries: Identification of novel tubulin polymerization inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 686–690. doi:10.1016/j.bmcl.2005.10.022.
- [34] G.M. Cragg, D.J. Newman, NATURAL PRODUCTS: A CONTINUING SOURCE OF NOVEL DRUG LEADS, *Biochim Biophys Acta.* 1830 (2013) 3670–3695. doi:10.1016/j.bbagen.2013.02.008.
- [35] T. Beghyn, R. Deprez-Poulain, N. Willand, B. Deprez, Natural Compounds : Leads or Ideas ? Bioinspired Molecules for Drug Discovery, *Chem Biol Drug Des.* 72 (2008) 3–15. doi:10.1111/j.1747-0285.2008.00673.x.
- [36] C. Hansch, The physicochemical approach to drug design and discovery (QSAR), *Drug Dev. Res.* 1 (2004) 267–309.
- [37] Y.C. Martin, A Practitioner’s Perspective of the Role of Quantitative Structure-Activity Analysis in Medicinal Chemistry, *J. Med. Chem.* 24 (1981) 229–237. doi:10.1021/jm00135a001.
- [38] C.W. Thornber, Isosterism and molecular modification in drug design., *Chem. Soc. Rev.* 8 (1979) 563–580. doi:10.1039/CS9790800563.
- [39] G.A. Patani, E.J. LaVoie, Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design, *Chem. Rev.* 96 (1996) 3147–3176. doi:10.1021/cr950066q.
- [40] H. Erlenmeyer, M. Leo, Über Pseudoatome, *Helv. Chim. Acta.* 15 (1932) 1171–1186. doi:10.1002/hlca.193201501132.
- [41] C.G. Wermuth, Glossary of Terms Used in Medicinal Chemistry, *Pure Appl. Chem.* 70 (1998) 1129–1143. doi:10.1002/9781118943670.app4.
- [42] R. Flower, What are all the things that aspirin does? This fascinating but simple and cheap drug has an assured future., *BMJ.* 327 (2003) 572–573. doi:10.1136/bmj.327.7415.572.
- [43] Y. Zhang, Y. Bao, Q. Dai, W. Yang, P. Cheng, L. Zhu, mTOR Signaling is Involved in Indomethacin and Nimesulide Suppression of Colorectal Cancer Cell Growth via a COX-2 Independent Pathway, *Ann. Surg. Oncol.* 18 (2011) 580–588. doi:10.1245/s10434-010-1268-9.
- [44] B.E. Evans, Methods for Drug Discovery: Development of Potent, Selective, Orally Effective Cholecystokinin Antagonists, *J. Med. Chem.* 31 (1988) 2235–2246. doi:10.1021/jm00120a002.
- [45] L. Costantino, D. Barlocco, Privileged Structures as Leads in Medicinal Chemistry, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 65–85. doi:10.2174/092986706775197999.
- [46] D. MacLean, J.J. Baldwin, Glossary of Terms Used in Combinatorial Chemistry, *J. Comb. Chem.* 2 (2000) 562–578. doi:10.1021/cc000071u.
- [47] M.A. Koch, L. Wittenberg, S. Basu, D.A. Jeyaraj, E. Gourzoulidou, K. Reinecke, A. Odermatt, H. Waldmann, Compound library development guided by protein structure similarity clustering and natural

- product structure, PNAS. 101 (2004) 16721–16726. doi:10.1073/pnas.0404719101.
- [48] M.A. Koch, A. Schuffenhauer, M. Scheck, S. Wetzel, M. Casaulta, A. Odermatt, P. Ertl, H. Waldmann, Charting biologically relevant chemical space : A structural classification of natural products (SCONP), PNAS. 102 (2005) 17272–17277. doi:10.1073/pnas.0503647102.
- [49] W.R.J.D. Galloway, A. Isidro-Llobet, D.R. Spring, Diversity-oriented synthesis as a tool for the discovery of novel biologically active small molecules, Nat. Commun. 1 (2010) 1–13. doi:10.1038/ncomms1081.
- [50] M. Kamel, W. Zagahary, R. Al-Wabli, M. Anwar, Synthetic approaches and potential bioactivity of different functionalized quinazoline and quinazolinone scaffolds, Egypt. Pharm. J. 15 (2016) 98–131. doi:10.4103/1687-4315.197580.
- [51] L. Xing, B. Rai, E.A. Lunney, Scaffold mining of kinase hinge binders in crystal structure database, J. Comput. Aided. Mol. Des. 28 (2014) 13–23. doi:10.1007/s10822-013-9700-4.
- [52] J. Kim, H. Kim, S.B. Park, Privileged structures: Efficient chemical “navigators” toward unexplored biologically relevant chemical spaces, J. Am. Chem. Soc. 136 (2014) 14629–14638. doi:10.1021/ja508343a.
- [53] H. Park, S. Hong, S. Hong, Identification of common inhibitors of wild-type and T315I mutant of BCR-ABL through the parallel structure-based virtual screening, J. Comput. Aided. Mol. Des. 26 (2012) 983–992. doi:10.1007/s10822-012-9593-7.
- [54] H. Choe, J. Kim, S. Hong, Structure-based design of flavone-based inhibitors of wild-type and T315I mutant of ABL, Bioorganic Med. Chem. Lett. 23 (2013) 4324–4327. doi:10.1016/j.bmcl.2013.05.095.
- [55] H. Park, S. Hong, J. Kim, S. Hong, Discovery of picomolar ABL kinase inhibitors equipotent for wild type and T315I mutant via structure-based de novo design., J. Am. Chem. Soc. 135 (2013) 8227–37. doi:10.1021/ja311756u.
- [56] P. Imming, The Practice of Medicinal Chemistry, Elsevier Ltd, Illkirch, 2008.
- [57] M.J.A. Walker, M.L.M. Soh, Tackling the need to teach integrative pharmacology and physiology: Problems and ways forward, Trends Pharmacol. Sci. 27 (2006) 130–133. doi:10.1016/j.tips.2006.01.002.
- [58] S.E. Hyman, MEDICINE: What Are the Right Targets for Psychopharmacology?, Science (80-.). 299 (2003) 350–351. doi:10.1126/science.1077141.
- [59] A. Prahallad, C. Sun, S. Huang, F. Di Nicolantonio, R. Salazar, D. Zecchin, R.L. Beijersbergen, A. Bardelli, R. Bernards, Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR, Nature. 483 (2012) 100–104. doi:10.1038/nature10868.
- [60] B.L. Roth, D.J. Sheffer, W.K. Kroeze, Magic shotguns versus magic bullets: Selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia, Nat. Rev. Drug Discov. 3 (2004) 353–359. doi:10.1038/nrd1346.
- [61] K. Kullander, R. Klein, MECHANISMS AND FUNCTIONS OF EPH AND EPHRIN SIGNALLING, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3 (2002) 475–486. doi:10.1038/nrm856.
- [62] H.B. Nygaard, C.H. van Dyck, S.M. Strittmatter, Fyn kinase inhibition as a novel therapy for Alzheimer’s disease, Alzheimers. Res. Ther. 6 (2014) 8. doi:10.1186/alzrt238.
- [63] L.F. Hennequin, J. Allen, J. Breed, J. Curwen, M. Fennell, T.P. Green, C.L. Der Brempt, R.A. Norman, A. Olivier, L. Otterbein, P.A. Ple, N. Warin, G. Costello, N-(5-Chloro-1,3-benzodioxol-4-yl)-7-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethoxy]-5- (tetrahydro-2H-pyran-4-yloxy)quinazolin-4-amine, a Novel, Highly Selective, Orally Available, Dual-Specific c-Src/Abl Kinase Inhibitor, J. Med. 49 (2006) 6465–6488. doi:10.1021/jm060434q.
- [64] J. Chen, Y. Peng, J. Zheng, Cytochrome P450 Mediated Bioactivation of Saracatinib, Chem. Res. Toxicol. 29 (2016) 1835–1842. doi:10.1021/acs.chemrestox.6b00242.
- [65] A. Kalgutkar, I. Gardner, R. Obach, C. Shaffer, E. Callegari, K. Henne, A. Mutlib, D. Dalvie, J. Lee, Y. Nakai, J. O’Donnell, J. Boer, S. Harriman, A Comprehensive Listing of Bioactivation Pathways of Organic Functional Groups, Curr. Drug Metab. 6 (2005) 161–225. doi:10.2174/1389200054021799.
- [66] Z.Z. Fang, K.W. Krausz, F. Li, J. Cheng, N. Tanaka, F.J. Gonzalez, Metabolic map and bioactivation of the anti-tumour drug nescapine, Br. J. Pharmacol. 167 (2012) 1271–1286. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02067.x.
- [67] F.P. Guengerich, E.M. Isin, Mechanisms of cytochrome P450 reactions, Acta Chim. Slov. 55 (2008) 7–19. doi:10.1107/S0021889813022358.
- [68] I. Nicolas, P. Le Maux, G. Simonneaux, Asymmetric catalytic cyclopropanation reactions in water, Coord. Chem. Rev. 252 (2008) 727–735. doi:10.1016/j.ccr.2007.09.003.
- [69] Q. Liu, Y. Sabnis, Z. Zhao, T. Zhang, S.J. Buhrlage, H. Jones, N.S. Gray, NIH Public Access, 20 (2014) 146–159. doi:10.1016/j.chembiol.2012.12.006.Developing.
- [70] M. Khaled, Z.-Z. Jiang, L.-Y. Zhang, Deoxypodophyllotoxin: a promising therapeutic agent from herbal medicine., J. Ethnopharmacol. 149 (2013) 24–34. doi:10.1016/j.jep.2013.06.021.
- [71] J.P. Michael, Quinoline, quinazoline and acridone alkaloids., Nat. Prod. Rep. 25 (2008) 166–187. doi:10.1039/np9971400605.
- [72] C. Rodriguez-Antona, M. Ingelman-Sundberg, Cytochrome P 450 pharmacogenetics and cancer, Oncogene. 25 (2006) 1679–1691. doi:10.1038/sj.onc.1209377.
- [73] S. Park, Catechol Estrogen 4-Hydroxyestradiol is an Ultimate Carcinogen in Breast Cancer, Biomed. Sci. Lett. 24 (2018) 143–149. doi:10.15616/BSL.2018.24.3.143.

- [74] G.A. Potter, L.H. Patterson, E. Wanogho, P.J. Perry, P.C. Butler, T. Ijaz, K.C. Ruparelia, J.H. Lamb, The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1, *Br. J. Cancer*. 86 (2002) 774–778. doi:10.1038/sj/bjc/6600197.
- [75] G.A. Potter, L.H. Patterson, M.D. Burke, Hydroxylation activated prodrugs US 6214886, 2001.
- [76] S.-H. Kim, A. Bajji, R. Tangallapally, B. Markovitz, R. Trovato, M. Shenderovich, V. Baichwal, P. Bartel, D. Cimborra, R. McKinnon, R. Robinson, D. Papac, D. Wettstein, R. Carlson, K.M. Yager, Discovery of (2S)-1-[4-(2-{6-Amino-8-[(6-bromo-1,3-benzodioxol-5-yl)sulfanyl]-9H-purin-9-yl]ethyl)piperidin-1-yl]-2-hydroxypropan-1-one (MPC-3100), a Purine-Based Hsp90 Inhibitor., *J Med Chem*. 55 (2012) 7480–7501. doi:10.1021/jm3004619.
- [77] M.A. Biamonte, J. Shi, K. Hong, D.C. Hurst, L. Zhang, J. Fan, D.J. Busch, P.L. Karjian, A.A. Maldonado, J.L. Sensintaffar, Y. Yang, A. Kamal, R.E. Lough, K. Lundgren, F.J. Burrows, G.A. Timony, M.F. Boehm, S.R. Kasibhatla, Orally Active Purine-Based Inhibitors of the Heat Shock Protein 90, *J. Med. Chem*. 49 (2006) 817–828. doi:10.1021/jm0503087.
- [78] C. Bardelle, D. Cross, S. Davenport, J.G. Kettle, E.J. Ko, A.G. Leach, A. Mortlock, J. Read, N.J. Roberts, P. Robins, E.J. Williams, Inhibitors of the tyrosine kinase EphB4. Part 1: Structure-based design and optimization of a series of 2,4-bis-anilinopyrimidines, *Bioorganic Med. Chem. Lett*. 18 (2008) 2776–2780. doi:10.1016/j.bmcl.2008.04.015.
- [79] C. Bardelle, T. Coleman, D. Cross, S. Davenport, J.G. Kettle, E.J. Ko, A.G. Leach, A. Mortlock, J. Read, N.J. Roberts, P. Robins, E.J. Williams, Inhibitors of the tyrosine kinase EphB4. Part 2: Structure-based discovery and optimisation of 3,5-bis substituted anilinopyrimidines, *Bioorganic Med. Chem. Lett*. 18 (2008) 5717–5721. doi:10.1016/j.bmcl.2008.09.087.
- [80] M.T. Conconi, G. Marzaro, L. Urbani, I. Zanusso, R. Di Liddo, I. Castagliuolo, P. Brun, F. Tonus, A. Ferrarese, A. Guiotto, A. Chilin, Quinazoline-based multi-tyrosine kinase inhibitors: Synthesis, modeling, antitumor and antiangiogenic properties, *Eur. J. Med. Chem*. 67 (2013) 373–383. doi:10.1016/j.ejmech.2013.06.057.
- [81] E.L. Kim, R. Wüstenberg, A. Rübsam, C. Schmitz-Salue, G. Warnecke, E.M. Bücken, N. Pettkus, D. Speidel, V. Rohde, W. Schulz-Schaeffer, W. Deppert, A. Giese, Chloroquine activates the p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells, *Neuro. Oncol*. 12 (2010) 389–400. doi:10.1093/neuonc/nop046.
- [82] M. Masud Alam, R. Kariya, A. Kawaguchi, K. Matsuda, E. Kudo, S. Okada, Inhibition of autophagy by chloroquine induces apoptosis in primary effusion lymphoma in vitro and in vivo through induction of endoplasmic reticulum stress, *Apoptosis*. 21 (2016) 1191–1201. doi:10.1007/s10495-016-1277-7.
- [83] Y. Mishima, Y. Terui, Y. Mishima, A. Taniyama, R. Kuniyoshi, T. Takizawa, S. Kimura, K. Ozawa, K. Hatake, Autophagy and autophagic cell death are next targets for elimination of the resistance to tyrosine kinase inhibitors, *Cancer Sci*. 99 (2008) 2200–2208. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00932.x.
- [84] J. Yuan, J. Liu, L. Zhang, Potent small molecule inhibitors of autophagy, and methods of use thereof, WO 2011011522A2, 2011.
- [85] J.P.J. Saeij, J.P. Boyle, S. Collier, S. Taylor, L.D. Sibley, E.T. Brooke-Powell, J.W. Ajioka, J.C. Boothroyd, Polymorphic secreted kinases are key virulence factors in toxoplasmosis, *Science* (80-.). 314 (2006) 1780–1783. doi:10.1126/science.1133690.
- [86] E. Kamau, T. Meehan, M.D. Lavine, G. Arrizabalaga, G.M. Wilson, J. Boyle, A novel benzodioxole-containing inhibitor of *Toxoplasma gondii* growth alters the parasite cell cycle, *Antimicrob. Agents Chemother*. 55 (2011) 5438–5451. doi:10.1128/AAC.00455-11.
- [87] J. Bliesath, N. Huser, M. Omori, D. Bunag, C. Proffitt, N. Streiner, C. Ho, A. Siddiqui-Jain, S.E. O'Brien, J.K.C. Lim, D.M. Ryckman, K. Anderes, W.G. Rice, D. Drygin, Combined inhibition of EGFR and CK2 augments the attenuation of PI3K-Akt-mTOR signaling and the killing of cancer cells, *Cancer Lett*. 322 (2012) 113–118. doi:10.1016/j.canlet.2012.02.032.
- [88] С.А. Старосила, М.В. Протопопов, О.Ю. Воскобойнік, І.С. Носуленко, Л.М. Антипенко, О.М. Антипенко, І.М. Фесун, С.І. Коваленко, С.М. Ярмолюк, Derivatives of tetrazolo[1,5-c]quinazolines as novel protein kinase CK2 inhibitors, *Ukr. Bioorganica Acta*. 1 (2014) 12–17.
- [89] О.М. Антипенко, С.І. Коваленко, О.В. Карпенко, В.О. Нікітін, Л.М. Антипенко, Synthesis, Anticancer, and QSAR Studies of 2-Alkyl(aryl,hetaryl)quinazolin-4(3H)-thione's and [1,2,4]Triazolo[1,5-c]quinazoline-2-thione's Thioderivatives, *Helv. Chim. Acta*. 99 (2016) 621–631. doi:10.1002/hlca.201600062.
- [90] G. M, Compounds for the treatment of disorders related to vasculogenesis and/or angiogenesis, US 5763441, 1998.
- [91] A.J. Bridges, Chemical inhibitors of protein kinases, *Chem. Rev*. 101 (2001) 2541–2571. doi:10.1021/cr000250y.
- [92] M.R. Myers, Aryl and heteroaryl quinazoline compounds which inhibit CSF-1R receptor tyrosine kinase, US 5714493A, 1998.
- [93] P. Verhaeghe, A. Dumetre, C. Castera-Ducros, S. Hutter, M. Laget, C. Fersing, M. Prieri, J. Yzombard, F. Sifredi, S. Rault, P. Rathelot, P. Vanelle, N. Azas, 4-Thiophenoxy-2-trichloromethylquinazolines display in vitro selective antiplasmodial activity against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*., *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 21 (2011) 6003–6006. doi:10.1016/j.bmcl.2011.06.113.

- [94] T. Schindler, W. Bornmann, P. Pellicena, W.T. Miller, B. Clarkson, J. Kuriyan, Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase., *Science*. 289 (2000) 1938–42. doi:10.1126/science.289.5486.1938.
- [95] S.N. Zhao, Zheng; Wu, Hong; Wang, Li; Liu, Yu; Knapp, Stefan; Liu, Qingsong; Gray, Exploration of Type II Binding Mode : A Privileged Approach for, *ACS Chem. Biol.* 9 (2014) 1230–1241. doi:10.1021/cb500129t.
- [96] E.H. Fischer, Phosphorylase and the origin of reversible protein phosphorylation, *Biol. Chem.* 391 (2010) 131–137. doi:10.1515/BC.2010.011.
- [97] E.G. Krebs, D.J. Graves, E.H. Fischer, Factors Affecting the Activity of Muscle Phosphorylase b Kinase, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 2867–2873.
- [98] E.H. Fischer, G. Krebs, CONVERSION OF PHOSPHORYLASE b TO PHOSPHORYLASE a IN MUSCLE EXTRACTS, *J. Biol. Chem.* 216 (1955) 121–132.
- [99] G. Manning, D.B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, The protein kinase complement of the human genome., *Science*. 298 (2002) 1912–34. doi:10.1126/science.1075762.
- [100] L. Wong, P.A. Jennings, J.A. Adams, Communication Pathways between the Nucleotide Pocket and Distal Regulatory Sites in Protein Kinases, *Acc. Chem. Res.* 37 (2004) 304–311. doi:10.1021/ar020128g.
- [101] S.S. Taylor, M.M. Keshwani, J.M. Steichen, A.P. Kornev, Evolution of the eukaryotic protein kinases as dynamic molecular switches, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 367 (2012) 2517–2528. doi:10.1098/rstb.2012.0054.
- [102] O.F. Meyerhof, Reversible Phosphorylation and Kinase Cascades: the Work of Edwin G. Krebs, *Biochemistry*. 280 (2005) 124–126. doi:10.1074/jbc.X400012200.
- [103] M. Inoue, a Kishimoto, Y. Takai, Y. Nishizuka, Studies on acyclic nucleotide independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues, *J.Biol.Chem.* 252 (21) (1977) 7610–7616.
- [104] J.A. Callender, A.C. Newton, Conventional protein kinase C in the brain: 40 years later, *Neuronal Signal*. 1 (2017) 1–10. doi:10.1042/NS20160005.
- [105] T. Hunter, B.M. Sefton, Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine., *PN.* 77 (1980) 1311–1315. doi:10.1073/pnas.77.3.1311.
- [106] P.K. Vogt, Retroviral oncogenes: A historical primer, *Nat. Rev. Cancer*. 12 (2012) 639–648. doi:10.1038/nrc3320.
- [107] G.S. Martin, Rous sarcoma virus: A function required for the maintenance of the transformed state, *Nature*. 227 (1970) 1021–1023. doi:10.1038/2271021a0.
- [108] P.H. Duesberg, P.K. Vogt, Differences between the ribonucleic acids of transforming and nontransforming avian tumor viruses., *PNAS*. 67 (1970) 1673–1680. doi:10.1073/pnas.67.4.1673.
- [109] M.F. Moran, C.A. Koch, D. Anderson, C. Ellis, L. England, G.S. Martin, T. Pawson, Src homology region 2 domains direct protein-protein interactions in signal transduction., *PNAS*. 87 (1990) 8622–8626. doi:10.1073/pnas.87.21.8622.
- [110] G. Watts, Anthony James Pawson, *Lancet*. 382 (2013) 1398. doi:10.1016/S0140-6736(13)62204-7.
- [111] H. Pluk, K. Dorey, G. Superti-Furga, Autoinhibition of c-Abl, *Cell*. 108 (2002) 247–259. doi:10.1016/S0092-8674(02)00623-2.
- [112] E.K. Greuber, P. Smith-Pearson, J. Wang, A.M. Pendergast, Role of ABL family kinases in cancer: From leukaemia to solid tumours, *Nat. Rev. Cancer*. 13 (2013) 559–571. doi:10.1038/nrc3563.
- [113] B.A. Liu, E. Shah, K. Jablonowski, A. Stergachis, B. Engelmann, P.D. Nash, The SH2 domain-containing proteins in 21 species establish the provenance and scope of phosphotyrosine signaling in eukaryotes, *Sci. Signal*. 4 (2011) 1–18. doi:10.1126/scisignal.2002105.
- [114] M. Zaliouva, A. V. Moorman, G. Cazzaniga, M. Stanulla, R.C. Harvey, K.G. Roberts, S.L. Heatley, M.L. Loh, M. Konopleva, I.M. Chen, O. Zimmermannova, C. Schwab, O. Smith, M.J. Mozziconacci, C. Chabannon, M. Kim, J.H. Frederik Falkenburg, A. Norton, K. Marshall, O.A. Haas, J. Starkova, J. Stuchly, S.P. Hunger, D. White, C.G. Mullighan, C.L. Willman, J. Stary, J. Trka, J. Zuna, Characterization of leukemias with ETV6-ABL1 fusion, *Haematologica*. 101 (2016) 1082–1093. doi:10.3324/haematol.2016.144345.
- [115] E.K. Greuber, M. Pendergast, Role of ABL Family Kinases in Cancer: from Leukemia to Solid Tumors, *Nat Rev Cancer*. 13 (2013) 559–571. doi:10.1038/nrc3563.
- [116] X. Zou, K. Calame, Signaling pathways activated by oncogenic forms of Abl tyrosine kinase, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 18141–18144. doi:10.1074/jbc.274.26.18141.
- [117] T. Hunter, Why nature chose phosphate to modify proteins, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 367 (2012) 2513–2516. doi:10.1098/rstb.2012.0013.
- [118] F.H. Westheimer, Nature Chose Phosphates The Role of Phosphates The Importance of Being Ionized, *Science*. 235 (1987) 1173–1178. doi:10.1126/science.2434996.
- [119] T. Hunter, J.A. Cooper, Protein-tyrosine kinases 1, *Cancer Res.* (1985) 897–930. doi:10.1146/annurev.bi.54.070185.004341.
- [120] T.C. Strong, G. Kaur, J.H. Thomas, Mutations in the catalytic loop HRD motif alter the activity and function of drosophila Src64, *PLoS One*. 6 (2011). doi:10.1371/journal.pone.0028100.
- [121] L.N. Johnson, R.J. Lewis, Structural basis for control by phosphorylation, *Chem. Rev.* 101 (2001) 2209–2242. doi:10.1021/cr000225s.
- [122] A.P. Kornev, S.S. Taylor, Defining the conserved internal architecture of a protein kinase, *Biochim.*

- Biophys. Acta - Proteins Proteomics. 1804 (2010) 440–444. doi:10.1016/j.bbapap.2009.10.017.
- [123] Y. Tokunaga, K. Takeuchi, H. Takahashi, I. Shimada, Allosteric enhancement of MAP kinase p38 's activity and substrate selectivity by docking interactions, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21 (2014) 704–711. doi:10.1038/nsmb.2861.
- [124] Y. Meng, B. Roux, Locking the active conformation of c-Src kinase through the phosphorylation of the activation loop, *J. Mol. Biol.* 426 (2014) 423–435. doi:10.1016/j.jmb.2013.10.001.
- [125] L.R. Masterson, A. Mascioni, N.J. Traaseth, S.S. Taylor, G. Veglia, Allosteric cooperativity in protein kinase A, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 506–511. doi:10.1073/pnas.0709214104.
- [126] T. Schindler, F. Sicheri, A. Pico, A. Gazit, A. Levitzki, J. Kuriyan, Crystal structure of Hck in complex with a Src family-selective tyrosine kinase inhibitor, *Mol. Cell.* 3 (1999) 639–648. doi:10.1016/S1097-2765(00)80357-3.
- [127] W. Xu, A. Doshi, M. Lei, M.J. Eck, S.C. Harrison, Crystal Structures of c-Src Reveal Features of Its Autoinhibitory Mechanism, *Mol. Cell.* 3 (1999) 629–638. doi:10.1016/S1097-2765(00)80356-1.
- [128] M. Porter, T. Schindler, J. Kuriyan, W.T. Miller, Reciprocal Regulation of Hck Activity by Phosphorylation of, *Biochemistry.* 275 (2000) 2721–2726. doi:10.1074/jbc.275.4.2721.
- [129] J.M. Steichen, G.H. Iyer, S. Li, A. Saldanha, M.S. Deal, V.L. Woods, S.S. Taylor, Global consequences of activation loop phosphorylation on protein kinase A, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 3825–3832. doi:10.1074/jbc.M109.061820.
- [130] M. Huse, J. Kuriyan, The conformational plasticity of protein kinases, *Cell.* 109 (2002) 275–282. doi:10.1016/S0092-8674(02)00741-9.
- [131] M.E.M. Noble, J.A. Endicott, L.N. Johnson, Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure., *Science.* 303 (2004) 1800–5. doi:10.1126/science.1095920.
- [132] E. Papaleo, G. Saladino, M. Lambrugh, K. Lindorff-Larsen, F.L. Gervasio, R. Nussinov, The Role of Protein Loops and Linkers in Conformational Dynamics and Allostery, *Chem. Rev.* 116 (2016) 6391–6423. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00623.
- [133] J.E. Walker, M. Saraste, M.J. Runswick, N.J. Gay, Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold., *EMBO J.* 1 (1982) 945–51. doi:10.1093/emboj/1.1.945.
- [134] A. Bianchi, C. Giorgi, P. Ruzza, C. Toniolo, E.J. Milner-White, A synthetic hexapeptide designed to resemble a proteinaceous p-loop nest is shown to bind inorganic phosphate, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 80 (2012) 1418–1424. doi:10.1002/prot.24038.
- [135] D. V Bugreev, A. V Mazin, Ca²⁺ activates human homologous recombination protein Rad51 by modulating its ATPase activity., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 9988–93. doi:10.1073/pnas.0402105101.
- [136] P.I. Hanson, S.W. Whiteheart, AAA+ proteins: Have engine, will work, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 519–529. doi:10.1038/nrm1684.
- [137] C. Ramakrishnan, V.S. Dani, T. Ramasarma, A conformational analysis of Walker motif A [GXXXXGKT (S)] in nucleotide-binding and other proteins, *Protein Eng.* 15 (2002) 783–798. doi:10.1093/protein/15.10.783.
- [138] M. Saraste, P.R. Sibbald, A. Wittinghofer, The P-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins, *Trends Biochem. Sci.* 15 (1990) 430–434. doi:10.1016/0968-0004(90)90281-F.
- [139] P. Akamine, N. Xuong, S.S. Taylor, Crystal structure of a transition state mimic of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase, *Nat. Struct. Biol.* 9 (2002) 273–277. doi:10.1038/nsb780.
- [140] R.A. Romano, N. Kannan, A.P. Kornev, C.J. Allison, S.S. Taylor, A chimeric mechanism for polyvalent trans-phosphorylation of PKA by PDK1, *Protein Sci.* 18 (2009) 1486–1497. doi:10.1002/pro.146.
- [141] L.M. Iyer, D.D. Leipe, E. V. Koonin, L. Aravind, Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases, *J. Struct. Biol.* 146 (2004) 11–31. doi:10.1016/j.jsb.2003.10.010.
- [142] R.M. Story, T.A. Steitz, Structure of the recA protein-ADP complex, *Nature.* 355 (1992) 374–376. doi:10.1038/355374a0.
- [143] C. Orelle, O. Dalmas, P. Gros, A. Di Pietro, J.M. Jault, The Conserved Glutamate Residue Adjacent to the Walker-B Motif is the Catalytic Base for ATP Hydrolysis in the ATP-binding Cassette Transporter BmrA, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 47002–47008. doi:10.1074/jbc.M308268200.
- [144] Y.L. Lin, Y. Meng, L. Huang, B. Roux, Computational Study of gleevec and G6G reveals molecular determinants of kinase inhibitor selectivity, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 14753–14762. doi:10.1021/ja504146x.
- [145] J.J.-L. Liao, Molecular Recognition of Protein Kinase Binding Pockets for Design of Potent and Selective Kinase Inhibitors, *J. Med. Chem.* 50 (2007) 409–424. doi:10.1021/jm0608107.
- [146] J. a. Bikker, J. a. Bikker, N. Brooijmans, N. Brooijmans, A. Wissner, A. Wissner, T.S. Mansour, T.S. Mansour, Kinase domain mutations in cancer: implications for small molecule drug design strategies., *J. Med. Chem.* 52 (2009) 1493–1509. doi:10.1021/jm8010542.
- [147] E. Koronakis, C. Hughes, I. Milisav, V. Koronakis, Protein exporter function and in vitro ATPase activity are correlated in ABC-domain mutants of HlyB, *Mol. Microbiol.* 16 (1995) 87–96. doi:10.1111/j.1365-2958.1995.tb02394.x.

- [148] M. Azzaria, E. Schurr, P. Gros, Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance., *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989) 5289–97. doi:10.1128/MCB.9.12.5289.
- [149] I.J.L. Byeon, Z. Shi, M.D. Tsai, Mechanism of Adenylate Kinase. The “Essential Lysine” Helps to Orient the Phosphates and the Active Site Residues to Proper Conformations, *Biochemistry.* 34 (1995) 3172–3182. doi:10.1021/bi00010a006.
- [150] S.W. Cowan-Jacob, G. Fendrich, A. Floersheimer, P. Furet, J. Liebetanz, G. Rummel, P. Rheinberger, M. Centeleghe, D. Fabbro, P.W. Manley, Structural biology contributions to the discovery of drugs to treat chronic myelogenous leukaemia, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 63 (2007) 80–93. doi:10.1107/S0907444906047287.
- [151] S. Roumiantsev, N.P. Shah, M.E. Gorre, J. Nicoll, B.B. Brasher, C.L. Sawyers, R.A. Van Etten, Clinical resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (2002) 10700–10705. doi:10.1073/pnas.162140299.
- [152] E. Weisberg, P.W. Manley, S.W. Cowan-Jacob, A. Hochhaus, J.D. Griffin, Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia, *Nat. Rev. Cancer.* 7 (2007) 345–356. doi:10.1038/nrc2126.
- [153] A.P. Kornev, S.S. Taylor, L.F. Ten Eyck, A helix scaffold for the assembly of active protein kinases, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 14377–14382. doi:10.1073/pnas.0807988105.
- [154] C.L. McClendon, A.P. Kornev, M.K. Gilson, S.S. Taylor, Dynamic architecture of a protein kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111 (2014) 4623–4631. doi:10.1073/pnas.1418402111.
- [155] J. Kim, L.G. Ahuja, F.A. Chao, Y. Xia, C.L. McClendon, A.P. Kornev, S.S. Taylor, G. Veglia, A dynamic hydrophobic core orchestrates allostery in protein kinases, *Sci. Adv.* 3 (2017) 1–10. doi:10.1126/sciadv.1600663.
- [156] A.P. Kornev, N.M. Haste, S.S. Taylor, L.F. Ten Eyck, Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (2006) 17783–17788. doi:10.1073/pnas.0607656103.
- [157] A.P. Kornev, S.S. Taylor, L.F. Ten Eyck, A generalized allosteric mechanism for cis-regulated cyclic nucleotide binding domains, *PLoS Comput. Biol.* 4 (2008). doi:10.1371/journal.pcbi.1000056.
- [158] D.R. Knighton, J. Zheng, L.F.T.E.N. Eyck, V.A. Ashford, N. Xuong, S.S. Taylor, J.M. Sowadski, Crystal Structure of the Catalytic Subunit of Cyclic Adenosine Monophosphate-Dependent Protein Kinase, *Science* (80-.). 253 (1991) 407–414. doi:10.1126/science.1862342.
- [159] W. Xu, A. Doshi, M. Lei, M.J. Eck, S.C. Harrison, Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism, *Mol. Cell.* 3 (1999) 629–638. doi:10.1016/S1097-2765(00)80356-1.
- [160] Y. Liu, N.S. Gray, Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations., *Nat. Chem. Biol.* 2 (2006) 358–364. doi:10.1038/nchembio799.
- [161] J. Wang, Q. Chen, M. Wang, C. Zhong, The opening/closure of the P-loop and hinge of BCR-ABL1 decodes the low/high bioactivities of dasatinib and axitinib, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19 (2017) 22444–22453. doi:10.1039/c7cp03443a.
- [162] Y. Liu, K. Shah, F. Yang, L. Witucki, K.M. Shokat, A Molecular Gate which Controls Unnatural ATP Analogue Recognition by the Tyrosine Kinase V-Src, *Bioorg. Med. Chem.* 6 (1998) 1219–1226. doi:10.1016/S0968-0896(98)00099-6.
- [163] S.S. Taylor, A.P. Kornev, Protein kinases : evolution of dynamic regulatory proteins, *Trends Biochem. Sci.* 36 (2011) 65–77. doi:10.1016/j.tibs.2010.09.006.
- [164] F. Zuccotto, E. Ardini, E. Casale, M. Angiolini, Through the “*gatekeeper* door”: Exploiting the active kinase conformation, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 2681–2694. doi:10.1021/jm901443h.
- [165] M. Getlik, C. Grütter, J.R. Simard, S. Klüter, M. Rabiller, H.B. Rode, A. Robubi, D. Rauh, Hybrid compound design to overcome the *gatekeeper* T338M mutation in cSrc, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 3915–3926. doi:10.1021/jm9002928.
- [166] M. Azam, M.A. Seeliger, N.S. Gray, J. Kuriyan, G.Q. Daley, Activation of tyrosine kinases by mutation of the *gatekeeper* threonine, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15 (2008) 1109–1118. doi:10.1038/nsmb.1486.
- [167] H. Daub, K. Specht, A. Ullrich, STRATEGIES TO OVERCOME RESISTANCE TO TARGETED PROTEIN KINASE INHIBITORS, *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 1001–1010. doi:10.1038/nrd1579.
- [168] S. Blencke, A. Ullrich, H. Daub, Mutation of threonine 766 in the epidermal growth factor receptor reveals a hotspot for resistance formation against selective tyrosine kinase inhibitors, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 15435–15440. doi:10.1074/jbc.M211158200.
- [169] T.A. Carter, L.M. Wodicka, N.P. Shah, A.M. Velasco, M.A. Fabian, D.K. Treiber, Z. V. Milanov, C.E. Atteridge, W.H. Biggs, P.T. Edeen, M. Floyd, J.M. Ford, R.M. Grotzfeld, S. Herrgard, D.E. Insko, S.A. Mehta, H.K. Patel, W. Pao, C.L. Sawyers, H. Varmus, P.P. Zarrinkar, D.J. Lockhart, Inhibition of drug-resistant mutants of ABL, KIT, and EGF receptor kinases, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (2005) 11011–11016. doi:10.1073/pnas.0504952102.
- [170] S. Lovera, M. Morando, E. Pucheta-Martinez, J.L. Martinez-Torrecedrada, G. Saladino, F.L. Gervasio, Towards a Molecular Understanding of the Link between Imatinib Resistance and Kinase Conformational Dynamics, *PLoS Comput. Biol.* 11 (2015). doi:10.1371/journal.pcbi.1004578.

- [171] D.L. Gibbons, S. Pricl, P. Posocco, E. Laurini, M. Fermeglia, H. Sun, M. Talpaz, N. Donato, A. Quintás-Cardama, Molecular dynamics reveal BCR-ABL1 polymutants as a unique mechanism of resistance to PAN-BCR-ABL1 kinase inhibitor therapy, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111 (2014) 3550–3555. doi:10.1073/pnas.1321173111.
- [172] Y. Peng, H. Shiao, C. Tu, P. Liu, J.T. Hsu, P.K. Amancha, J.-S. Wu, M.S. Coumar, C.-H. Chen, S. Wang, W. Lin, H. Sun, Y. Chao, P. Lyu, H. Hsieh, S.-Y. Wu, Protein Kinase Inhibitor Design by Targeting the Asp-Phe-Gly (DFG) Motif: The Role of the DFG Motif in the Design of Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors, *J. Med. Chem.* 56 (2013) 3889–3903. doi:10.1021/jm400072p.
- [173] Y. Meng, Y. Lin, Computational Study of the “DFG-Flip” Conformational Transition in c - Abl and c - Src Tyrosine Kinases, *J. Phys. Chem. B.* 119 (2015) 1443–1456. doi:10.1021/jp511792a.
- [174] S.R. Hubbard, Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor, *Nature.* 372 (1994) 746–754. doi:10.1038/372746a0.
- [175] J. Yang, P. Cron, V. Thompson, V.M. Good, D. Hess, B.A. Hemmings, D. Barford, F. Miescher-institut, Molecular Mechanism for the Regulation of Protein Kinase B/Akt by Hydrophobic Motif Phosphorylation, *Mol. Cell.* 9 (2002) 1227–1240. doi:10.1016/S1097-2765(02)00550-6.
- [176] M.S. Zabriskie, C.A. Eide, D. Yan, N.A. Vellore, A.D. Pomicter, S.L. Savage, B.J. Druker, M.W. Deininger, T. O'Hare, Extreme mutational selectivity of axitinib limits its potential use as a targeted therapeutic for BCR-ABL1-positive leukemia, *Leukemia.* 30 (2016) 1418–1421. doi:10.1038/leu.2015.318.
- [177] X. Zhang, J. Gureasko, K. Shen, P.A. Cole, J. Kuriyan, An Allosteric Mechanism for Activation of the Kinase Domain of Epidermal Growth Factor Receptor, *Cell.* 125 (2006) 1137–1149. doi:10.1016/j.cell.2006.05.013.
- [178] K.A. James, G.M. Verkhivker, Structure-Based Network Analysis of Activation Mechanisms in the ErbB Family of Receptor Tyrosine Kinases : The Regulatory Spine Residues Are Global Mediators of Structural Stability and Allosteric Interactions, *PLoS One.* 9 (2014) 1–46. doi:10.1371/journal.pone.0113488.
- [179] A. Arkhipov, Y. Shan, R. Das, N.F. Endres, M.P. Eastwood, D.E. Wemmer, J. Kuriyan, D.E. Shaw, Architecture and membrane interactions of the EGF receptor, *Cell.* 152 (2013) 557–569. doi:10.1016/j.cell.2012.12.030.
- [180] H.K. Gan, A.N. Cvrljevic, T.G. Johns, The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): Where wild things are altered, *FEBS J.* 280 (2013) 5350–5370. doi:10.1111/febs.12393.
- [181] J. Peltier, A. O'Neill, D. V. Schaffer, PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation, *Dev. Neurobiol.* 67 (2007) 1348–1361. doi:10.1002/dneu.20506.
- [182] R. Marcotte, L. Zhou, H. Kim, C.D. Roskelly, W.J. Muller, c-Src Associates with ErbB2 through an Interaction between Catalytic Domains and Confers Enhanced Transforming Potential, *Mol. Cell. Biol.* 29 (2009) 5858–5871. doi:10.1128/MCB.01731-08.
- [183] B. Levine, G. Kroemer, Autophagy in the Pathogenesis of Disease, *Cell.* 132 (2008) 27–42. doi:10.1016/j.cell.2007.12.018.
- [184] V. Nardi, M. Azam, G.Q. Daley, Mechanisms and implications of imatinib resistance mutations in BCR-ABL, *Curr. Opin. Hematol.* 11 (2004) 35–43.
- [185] M. Koptyra, M. Nieborowska-Skorska, E.B. Gillespie, T. Stoklosa, G. Hoser, M. Wasik, M. Muschen, C. Richardson, T. Skorski, Normal ABL1 Is a Tumor Suppressor and Therapeutic Target In BCR-ABL1–positive Leukemias, *Blood.* 122 (2013) 2131–2144. doi:10.1182/blood-2015-11-681171.The.
- [186] A. Virgili, M. Koptyra, Y. Dasgupta, E. Glodkowska-Mrowka, T. Stoklosa, E.P. Nacheva, T. Skorski, Imatinib sensitivity in BCR-ABL1-positive chronic myeloid leukemia cells is regulated by the remaining normal ABL1 allele, *Cancer Res.* 71 (2011) 5381–5386. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0068.
- [187] P.A. Zipfel, W. Zhang, M. Quiroz, A.M. Pendergast, Requirement for Abl Kinases in T Cell Receptor Signaling, *Curr. Biol.* 14 (2004) 1222–1231. doi:10.1016/j.cub.2004.07.021.
- [188] E. Buchdunger, A. Matter, B.J. Druker, Bcr-Abl inhibition as a modality of CML therapeutics, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer.* 1551 (2001). doi:10.1016/S0304-419X(01)00022-1.
- [189] D. Cilloni, G. Saglio, Molecular pathways: BCR-ABL, *Clin. Cancer Res.* 18 (2012) 930–937. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1613.
- [190] E.A. Burton, R. Plattner, A.M. Pendergast, Abl tyrosine kinases are required for infection by Shigella flexneri, *EMBO J.* 22 (2003) 5471–5479. doi:10.1093/emboj/cdg512.
- [191] J. Zhang, F.J. Adrián, W. Jahnke, S.W. Cowan-Jacob, A.G. Li, R.E. Iacob, T. Sim, J. Powers, C. Dierks, F. Sun, G.R. Guo, Q. Ding, B. Okram, Y. Choi, A. Wojciechowski, X. Deng, G. Liu, G. Fendrich, A. Strauss, N. Vajpai, S. Grzesiek, T. Tuntland, Y. Liu, B. Bursulaya, M. Azam, P.W. Manley, J.R. Engen, G.Q. Daley, M. Warmuth, N.S. Gray, Targeting Bcr-Abl by combining allosteric with ATP-binding-site inhibitors, *Nature.* 463 (2010) 501–506. doi:10.1038/nature08675.
- [192] L. Skora, J. Mestan, D. Fabbro, W. Jahnke, S. Grzesiek, NMR reveals the allosteric opening and closing of Abelson tyrosine kinase by ATP-site and myristoyl pocket inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (2013) 4437–4445. doi:10.1073/pnas.1314712110.
- [193] J. Zhang, F.J. Adrián, W. Jahnke, S.W. Cowan-Jacob, A.G. Li, R.E. Iacob, T. Sim, J. Powers, C. Dierks, F. Sun, G. Guo, Q. Ding, B. Okram, Y. Choi, A. Wojciechowski, X. Deng, G. Liu, G. Fendrich, A. Strauss, N. Vajpai, S. Grzesiek, T. Tuntland, Y. Liu, B. Bursulaya, M. Azam, P.W. Manley, J.R. Engen, G.Q. Daley, M.

- Warmuth, N.S. Gray, Targeting Bcr–Abl by combining allosteric with ATP-binding-site inhibitors, *Nature*. 463 (2010) 501–506. doi:10.1038/nature08675.
- [194] R.E. Iacob, J. Zhang, N.S. Gray, J.R. Engen, Allosteric interactions between the myristate- and ATP-site of the Abl kinase, *PLoS One*. 6 (2011). doi:10.1371/journal.pone.0015929.
- [195] X. Deng, B. Okram, Q. Ding, J. Zhang, Y. Choi, F.J. Adrián, A. Wojciechowski, G. Zhang, J. Che, B. Bursulaya, S.W. Cowan-Jacob, G. Rummel, T. Sim, N.S. Gray, Expanding the diversity of allosteric Bcr-Abl inhibitors, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 6934–6946. doi:10.1021/jm100555f.
- [196] J.J. Heynekamp, W.M. Weber, L.A. Hunsaker, A.M. Gonzales, R.A. Orlando, L.M. Deck, D.L. Vander Jagt, Substituted trans-stilbenes, including analogues of the natural product resveratrol, inhibit the human tumor necrosis factor alpha-induced activation of transcription factor nuclear factor kappaB, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 7182–7189. doi:10.1021/jm060630x.
- [197] H.J. Soscún Machado, A. Hinchliffe, Relationships between the HOMO energies and pK_a values in monocyclic and bicyclic azines, *J. Mol. Struct. THEOCHEM.* 339 (1995) 255–258. doi:10.1016/0166-1280(94)04108-5.
- [198] B. Machura, M. Wolff, W. Kowalczyk, R. Musiol, Novel rhenium (V) complexes of 8-hydroxyquinoline derivatives – Synthesis , spectroscopic characterization , X-ray structure and DFT calculations, *Polyhedron*. 33 (2012) 388–395. doi:10.1016/j.poly.2011.11.051.
- [199] J.W. Lockman, Y. Klimova, M.B. Anderson, J.A. Willardsen, Synthesis of Substituted Quinazolines: Application to the Synthesis of Verubulin, *Synth. Commun.* 42 (2012) 1715–1723. doi:10.1080/00397911.2010.529730.
- [200] B.D. Shaw, E.A. Wagstaff, The Reaction between 2-Picoline and Aromatic Aldehydes, *J. Chem. Soc.* (1933) 77–79. doi:10.1039/JR9330000077.
- [201] M.-C. Chiang, W.H. Hartung, SYNTHESIS OF SOME STILBAZOLE DERIVATIVES, *J. Org. Chem.* 10 (1945) 21–25. doi:10.1021/jo01177a004.
- [202] R. Musiol, J. Jampilek, V. Buchta, L. Silva, H. Niedbala, B. Podeszwa, A. Palka, K. Majerz-Maniecka, B. Oleksyn, J. Polanski, Antifungal properties of new series of quinoline derivatives., *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 3592–8. doi:10.1016/j.bmc.2006.01.016.
- [203] J. Jampilek, R. Musiol, J. Finster, M. Pesko, J. Carroll, K. Kralova, M. Vejsova, J. O'Mahony, A. Coffey, J. Dohnal, J. Polanski, Investigating Biological Activity Spectrum for Novel Styrylquinazoline Analogues, *Molecules*. 14 (2009) 4246–4265. doi:10.3390/molecules14104246.
- [204] S.J. Lee, Y. Konishi, D.T. Yu, T.A. Miskowski, C.M. Riviello, O.T. Marina, M.R. Frierson, K. Kondo, M. Sugitani, J.C. Sircar, K.M. Blazejewski, Discovery of Potent Cyclic GMP Phosphodiesterase Inhibitors. 2-Pyridyl- and 2-Imidazolylquinazolines Possessing Cyclic GMP Phosphodiesterase and Thromboxane Synthesis Inhibitory Activities, *J. Med. Chem.* 38 (1995) 3547–3557. doi:10.1021/jm00018a014.
- [205] Y. Peng, G. Qiu, Q. Yang, J. Yuan, Z. Deng, Direct sulfanylation of 4-quinazolinone via c-oh bond activation: An efficient route to 2-aryl-4-sulfanylation quinazolines, *Synthesis (Stuttg.)*. 44 (2012) 1237–1246. doi:10.1055/s-0031-1289731.
- [206] A. Badwan, Benzene sulfonamides as PDE-V inhibitors for the use against erectile dysfunction, *EP* 1219614A1, 2002.
- [207] K. Geoghegan, S. Smullen, P. Evans, Halonium ion triggered rearrangement of unsaturated benzo-annulated bi- and tricyclic sulfonamides, *J. Org. Chem.* 78 (2013) 10443–10451. doi:10.1021/jo401888f.
- [208] E. V. Bellale, M.K. Chaudhari, K.G. Akamanchi, A simple, fast and chemoselective method for the preparation of arylthiols, *Synthesis (Stuttg.)*. (2009) 3211–3213. doi:10.1055/s-0029-1216955.
- [209] J. Mularski, K. Malarz, M. Pacholczyk, R. Musiol, European Journal of Medicinal Chemistry The p53 stabilizing agent CP-31398 and multi-kinase inhibitors . Designing , synthesizing and screening of styrylquinazoline series, *Eur. J. Med. Chem.* 163 (2019) 610–625. doi:10.1016/j.ejmech.2018.12.012.
- [210] S. Yang, Z. Li, L. Jin, B. Song, G. Liu, J. Chen, Z. Chen, D. Hu, W. Xue, R. Xu, Synthesis and bioactivity of 4-alkyl(aryl)thioquinazoline derivatives, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 17 (2007) 2193–2196. doi:10.1016/j.bmcl.2007.01.101.
- [211] V.M. Buha, D.N. Rana, M.T. Chhabria, K.H. Chikhalia, B.M. Mahajan, P.S. Brahmikshatriya, N.K. Shah, Synthesis, biological evaluation and QSAR study of a series of substituted quinazolines as antimicrobial agents, *Med. Chem. Res.* 22 (2013) 4096–4109. doi:10.1007/s00044-012-0408-0.
- [212] A.I. Sánchez, V. Martínez-Barrasa, C. Burgos, J.J. Vaquero, J. Alvarez-Builla, E. Terricabras, V. Segarra, Synthesis and evaluation of quinazoline derivatives as phosphodiesterase 7 inhibitors, *Bioorganic Med. Chem.* 21 (2013) 2370–2378. doi:10.1016/j.bmc.2013.01.067.
- [213] Z. Wan, D. Hu, P. Li, D. Xie, X. Gan, Synthesis, antiviral bioactivity of novel 4-thioquinazoline derivatives containing chalcone moiety, *Molecules*. 20 (2015) 11861–11874. doi:10.3390/molecules200711861.
- [214] Y.-C. Cheng, W.H. Prusoff, RELATIONSHIP BETWEEN THE INHIBITION CONSTANT AND THE CONCENTRATION OF INHIBITOR WHICH CAUSES 50 PER CENT INHIBITION OF AN ENZYMATIC REACTION, *Biochem. Pharmacol.* 22 (1973) 3099–3108. doi:10.1016/0006-2952(73)90196-2.
- [215] A.V. Hill, The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves, *Proc. Physiol. Soc.* (1910) 4–7.
- [216] H. Gubler, U. Schopfer, E. Jacoby, Theoretical and Experimental Relationships between Percent

- Inhibition and IC50 Data Observed in High-Throughput Screening, *J. Biomol. Screen.* 18 (2013) 1–13. doi:10.1177/1087057112455219.
- [217] J. Lopez, C. Hesling, J. Prudent, N. Popgeorgiev, R. Gadet, I. Mikaelian, R. Rimokh, G. Gillet, P. Gonzalo, Src tyrosine kinase inhibits apoptosis through the Erk1 / 2- dependent degradation of the death accelerator Bik, *Cell Death Differ.* 19 (2012) 1459–1469. doi:10.1038/cdd.2012.21.
- [218] M.R. Myers, Aryl and heteroaryl quinazoline compounds which inhibit EGF and/or PDGF receptor tyrosine kinase, US 5710158A, 1998.
- [219] D.G. Myszka, The ABRF-MIRG'02 Study: Assembly State, Thermodynamic, and Kinetic Analysis of an Enzyme/Inhibitor Interaction, *J. Biomol. Tech.* 14 (2003) 247–269.
- [220] J. Tellinghuisen, Calibration in isothermal titration calorimetry : Heat and cell volume from heat of dilution of NaCl (aq), *Anal. Biochem.* 360 (2007) 47–55. doi:10.1016/j.ab.2006.10.015.
- [221] F. Dullweber, G. Klebe, Factorising Ligand Affinity : A Combined Thermodynamic and Crystallographic Study of Trypsin and Thrombin Inhibition, *J. Mol. Biol.* 313 (2001) 593–614. doi:10.1006/jmbi.2001.5062.
- [222] M.N. Drwal, G. Bret, C. Perez, E. Kellenberger, Structural Insights on Fragment Binding Mode Conservation, *J. Med. Chem.* 61 (2018) 5963–5973. doi:10.1021/acs.jmedchem.8b00256.
- [223] H. Qiu, W.T. Miller, Regulation of the Nonreceptor Tyrosine Kinase Brk by Autophosphorylation and by Autoinhibition, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 34634–34641. doi:10.1074/jbc.M203877200.
- [224] J.D.D. Richard E. Rosenfield Jr., R. Parthasarathy, Directional preferences of nonbonded atomic contacts with divalent sulfur. 1. Electrophiles and nucleophiles, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 4860–4862. doi:10.1021/ja00456a072.
- [225] C. Bissantz, B. Kuhn, M. Stahl, A medicinal chemist's guide to molecular interactions, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 5061–5084. doi:10.1021/jm100112j.
- [226] M.J. McGregor, A pharmacophore map of small molecule protein kinase inhibitors, *J. Chem. Inf. Model.* 47 (2007) 2374–2382. doi:10.1021/ci700244t.
- [227] T. Pemovska, E. Johnson, M. Kontro, G.A. Repasky, J. Chen, P. Wells, C.N. Cronin, M. McTigue, O. Kallioniemi, K. Porkka, B.W. Murray, K. Wennerberg, Axitinib effectively inhibits BCR-ABL1(T315I) with a distinct binding conformation, *Nature.* 519 (2015) 102–105. doi:10.1038/nature14119.
- [228] T. Pene-dumitrescu, T.E. Smithgall, Expression of a Src Family Kinase in Chronic Myelogenous Leukemia Cells Induces Resistance to Imatinib in a Kinase-dependent Manner, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 21446–21457. doi:10.1074/jbc.M109.090043.
- [229] M. Olivier, M. Hollstein, P. Hainaut, TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2 (2010) 1–17. doi:10.1101/cshperspect.a001008.
- [230] K. Hanaya, S. Yoshioka, S. Ariyasu, S. Aoki, M. Shoji, T. Sugai, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Development of a novel sulfonate ester-based prodrug strategy, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2015) 27–29. doi:10.1016/j.bmcl.2015.11.074.
- [231] H.M. Hassan, O.M.O. Habib, E.B. Moawad, G.G. El-Bana, A.M. El Defrawy, Synthesis of some novel antioxidant and anticorrosive additives for Egyptian gasoline motor oils, *Lubr. Sci.* 23 (2011) 119–138. doi:10.1002/lvs.146.